

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE

par P. NÉLIS

avec la collaboration du professeur J. J. BOUCKAERT
pour la partie physiologique
et du Dr E. PICARD pour l'étude anatomo-pathologique.

I. — Introduction.

Frappé par l'action puissante qu'exerce l'anatoxine dans la vaccination antidiphthérique, après avoir enregistré nous-même les progrès récents réalisés dans ce domaine par la préparation de vaccins de haute valeur antigénique, nous nous sommes demandé s'il n'était pas possible de réaliser, au moyen de toxines staphylococciques, la préparation d'une « anastaphylotoxine » capable de jouer un rôle dans certaines affections déterminées par le staphylocoque.

Telle est l'hypothèse qui nous a guidé dans ce travail. Estimant qu'avant d'entreprendre des essais dans cette voie, il était indispensable de bien connaître la préparation de la toxine et les propriétés de ce poison, nous avons consacré ce premier mémoire à l'examen de ces deux questions préliminaires.

II. — Aperçu historique.

Il semble difficile d'établir exactement à qui revient le mérite de la découverte de la toxine staphylococcique; car si l'existence de poisons présents dans les cultures totales de staphylocoques était déjà démontrée par Arloing, en 1891, et surtout par Rodet et Courmont, en 1892, au moyen de techniques physiologiques, il s'agissait de poisons peu ou pas filtrables, produisant une prédisposition à l'infection staphylococcique et activant les phénomènes suppuratifs.

Mais, en 1893, J. Denys et H. Vandevelde démontrent l'existence d'une toxine staphylococcique décelable *in vitro* et *in vivo*, filtrable, capable d'engendrer une antitoxine staphylococcique et de déterminer ainsi une certaine résistance vis-à-vis de l'infection staphylococcique chez les animaux traités.

A ce poison ils donnent le nom de *leucocidine*, à cause de sa propriété spécifique de détruire les leucocytes.

« Dans l'exsudat formé dans la plèvre par l'injection de staphylocoques, comme dans les milieux artificiels, il s'élabore une substance hautement délétère pour les leucocytes et à laquelle nous avons donné le nom de leucocidine. D'autres cellules paraissent également sensibles à ce poison... Ainsi, nous avons constaté la dégénérescence des cellules éosinophiles après un contact d'une minute avec l'exsudat à leucocidine. Après sept minutes, les hémotoblastes étaient bientôt atteints à leur tour.

Les globules rouges subissent également une altération; ils se gonflent et se *dissolvent*.

Les cellules nerveuses elles-mêmes (ganglion sympathique du lapin) montrent des altérations analogues. »

Comme on le constate, c'est à ces deux savants belges qu'il faut attribuer également la découverte de l'hémolysine staphylococcique, et même l'action lytique générale de ce poison.

Krauss, puis Neisser et Wechsberg, en 1901, confirment l'existence de l'hémolysine staphylococcique.

En 1914, Dumas, dans une étude sur le staphylocoque

doré, range le pouvoir hémolytique parmi les caractères des staphylocoques.

La même année, M. Nicolle et Césari précisent le pouvoir des différentes souches de staphylocoques; ils distinguent, dans la toxine, le pouvoir hémolytique, le pouvoir léthal et le pouvoir escharotique, qu'ils rapportent à une seule et même substance.

En 1922, Walbum, examinant les conditions générales de la production des toxines *in vitro*, étudie spécialement les conditions optima de l'élaboration de l'hémolysine staphylococcique; il précise notamment l'importance du *pH* initial de la culture, de la présence de certains sels ($MgSO_4$) etc.

En 1924, Julia Parker montre que la toxine staphylococcique possède un pouvoir électif pour le derme; avec A. Gunther (1931), elle donne à la dermatoxine une identité propre, la séparant ainsi de l'hémolysine et de la leucocidine staphylococciques.

En 1929, F. M. Burnet fournit de nouveaux arguments en faveur de l'unicité de la toxine staphylococcique mise en doute par d'autres; il apporte des modifications utiles à la composition du bouillon, et introduit la notion des cultures en milieu gazeux spécial (air chargé de CO_2).

O. Gengou (1930-1932) renforce la théorie de l'unicité de la toxine staphylococcique par la méthode d'épuisement; il étend la propriété lytique à d'autres cellules de l'organisme, telles les cellules hépatiques, spléniques, etc.

Signalons encore les essais de cuti-réactions de Gertrude Remé au moyen de toxine staphylococcique; ceux de Pauton et Valentine; ceux de Dolman; ceux de Parish et Clarke, confirmant, tous, certains des points envisagés ci-dessus.

Faut-il rattacher à la toxine staphylococcique la propriété que possèdent certaines souches de staphylocoques de coaguler le plasma oxalaté [Much (1908); Kleinmilch (1908); Gonzenbach (1918); Gratia (1919)]?

Après Gratia, Hans Gross (1931) retrouve cette staphylocoagulase dans les filtrats stériles; d'après ce dernier, les hémolysines les plus actives sont fournies par les staphylocoques fortement hémolytiques, à action nécrosante intense et déterminant rapidement la coagulation du plasma citraté du lapin.

Par contre, O. Gengou (1933), qui étudie cette question, pense que la staphylocoagulase est retenue en grande partie par le filtre.

*
* *

Dans ce travail, nous donnons le nom de *toxine staphylococcique* au filtrat du bouillon de culture de staphylocoques. Cette toxine doit posséder les trois propriétés principales suivantes :

1° Introduite dans la circulation générale du lapin, elle le tue en quelques minutes, même à faible dose ;

2° Elle possède une action lytique particulièrement marquée sur les globules rouges du lapin ;

3° Injectée à faibles doses dans le derme du lapin, elle détermine en quelques jours une escarre typique.

III. — Production de la toxine staphylococcique.

Une des questions primordiales à envisager, lorsqu'on veut étudier une toxine, c'est de pouvoir la produire convenablement ; or, la production d'une toxine microbienne dépend de deux facteurs. Le premier de ces facteurs consiste en *un milieu de culture* propice ; l'exemple qui illustre le mieux cette proposition est celui de la toxine diphtérique. En utilisant le même germe (souche américaine W), mais en modifiant le bouillon de culture, on est passé de toxines titrant 200 à 300 d. m. m. à 2.000, 3.000 d. m. m., soit un décuplement du pouvoir toxique.

L'autre facteur, c'est la *souche toxigène* ; il existe, pour une même espèce, des souches non toxigènes. On peut donc, par sélection, obtenir une souche toxigène ; de même, on peut, théoriquement du moins, exalter artificiellement le pouvoir toxigène d'une souche.

A. — MILIEUX DE CULTURE POUR LA PRODUCTION DE TOXINE.

Voyons d'abord successivement les milieux proposés par les auteurs qui ont produit la toxine staphylococcique.

Dumas utilise le milieu T. composé comme suit : peptone Chapoteaut, 4 p. 100 ; sel marin, 0,5 p. 100 ; glucose, 0,2 p. 100.

Il alcalinise légèrement et examine le pouvoir hémolytique après cinq jours d'étuve à 37°.

M. Nicolle et Césari emploient le bouillon Martin glucosé à 2 p. 100 et filtrent sur Berkefeld après cinq jours d'étuve.

H. Gross prépare un bouillon ordinaire qu'il additionne de 1 à 4 p. 100 de peptone de Witte.

Walbum, qui a spécialement étudié la composition des milieux, propose la formule suivante :

Bouillon simple.	1.000
Sel	Quantité habituelle.
Peptone de Witte, p. 100.	0,5
Phosphate acide de potassium, p. 100 . . .	0,2
Sulfate de magnésium, p. 100.	0,03

J. Parker se sert du milieu de Walbum, légèrement modifié comme suit : à du bouillon ordinaire sans sucre, contenant 4 p. 100 de peptone de Witte, on ajoute une solution tampon de phosphate; le pH doit se trouver aux environs de 7,4.

Enfin Burnet se sert, lui aussi, d'un milieu de culture du type Walbum ainsi composé: l'extrait de viande, obtenu par addition de 1 litre d'eau à 500 grammes de cœur de bœuf, est dilué à 50 p. 100; après quoi on ajoute 0,5 p. 100 de peptone de Witte, 0,2 p. 100 de KH_2PO_4 et 0,03 p. 100 de MgSO_4 sans addition de NaCl ; le pH est amené à 7,0. Les cultures sont soumises à une atmosphère renfermant 10 p. 100 de CO_2 .

Notre premier soin a été d'étudier comparativement ces différents milieux, en utilisant la même souche dans les mêmes conditions d'expérimentation.

TECHNIQUE. — Nous rattachant, ainsi que nous le démontrons plus loin, à la théorie uniciste, nous avons considéré, au cours de cette étude, le pouvoir hémolytique comme reflétant le pouvoir toxique tout entier. La recherche du pouvoir hémolytique consiste à déterminer la plus petite quantité de toxine capable d'hémolyser 1 goutte de globules rouges de lapins, lavés trois fois et dilués au tiers; on ramène les tubes au volume égal de 2 cent. cubes par addition d'eau physiologique. Après le mélange, les tubes sont portés une heure à 37°, puis à la glacière. La lecture s'effectue lorsque les globules non hémoly-

lysés sont sédimentés, soit une heure et demie à deux heures après la mise à la glacière.

EXPÉRIENCE I. — *Comparaison entre le milieu T et le milieu de Walbum pour la production de la toxine.*

Huit ballons sontensemencés avec la même quantité d'une émulsion de staphylocoques (souche n° 37, 4 contiennent le milieu T; 4 le milieu W. La production de l'hémolysine est contrôlée à différents temps :

a) Après deux jours de culture :

	DILUTIONS DE LA TOXINE					
	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01
<i>Milieu T.</i>						
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—
<i>Milieu W.</i>						
5	—	—	—	—	—	—
6	++	+++	+	—	—	—
7	+++	+++	+	—	—	—
8	++++	++++	+++	+	—	—

b) Après quatre jours de culture :

	DILUTIONS DE LA TOXINE					
	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01
<i>Milieu T.</i>						
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—
<i>Milieu W.</i>						
5	++++	++++	++++	++++	++++	+
6	++++	++++	++++	++++	++++	++
7	++++	++++	++++	++	—	—
8	++++	++++	—	—	—	—

Signification des abréviations : +++, hémolyse totale; ++, hémolyse subtotale; +, hémolyse partielle; +, faible hémolyse; —, absence complète d'hémolyse.

c) Après six jours de culture.

DILUTIONS DE LA TOXINE									
	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001
<i>Milieu T.</i>									
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Milieu W.</i>									
7	++++	++++	++++	++++	++++	+	—	—	—
8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+

Les dosages des huitième et dixième jours donnent les mêmes résultats : pas d'hémolyse appréciable dans le milieu T; forte hémolyse dans le milieu de Walbum.

EXPÉRIENCE II. — *Essai comparatif de production de toxine dans le bouillon Martin glucosé à 2 p. 100 (nos 1 et 2), dans le bouillon Martin simple (nos 3 et 4) et dans le milieu de Walbum (nos 5, 6, 7 et 8).*

Après huit jours de culture :

DILUTIONS DE LA TOXINE							
	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005
<i>Milieu Martin.</i>							
1	++++	++++	++++	++++	—	—	—
2	++++	++++	+	+	—	—	—
3	++++	++++	++++	++++	+++	—	—
4	++++	++++	++++	++++	+	—	—
<i>Milieu W.</i>							
5	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—
6	++++	++++	++++	++++	++++	+	—
7	++++	++++	++++	++++	++++	+	—
8	++++	++++	++++	++++	++++	—	—

La faible différence en faveur du milieu de Walbum se maintient dans les dosages suivants; le bouillon Martin se montre donc un bon milieu de culture pour la production de toxine staphylococcique; le milieu de Walbum paraît, cependant, rester le milieu de choix, ainsi qu'il appert d'autres essais analogues non rapportés ici.

Nous nous sommes efforcé d'augmenter la valeur du milieu de Walbum soit par addition d'hémoglobine (poudre d'hémoglobine), soit par addition de sérum ou de liquide d'ascite, sans y réussir. De même, l'addition d'acétate de soude, suivant les indications de G. Ramon, n'augmente pas pratiquement la production de toxine.

Les essais effectués au moyen de milieux synthétiques du type Sauton sont restés absolument négatifs. Il en est de même des filtrats d'émulsions de staphylocoques cultivés sur gélose.

Il résulte de nos essais préliminaires que le milieu de Walbum s'est montré le plus favorable à la production de toxine et que les différentes modifications apportées à sa composition ne l'ont pas pratiquement amélioré.

Nous nous sommes alors demandé s'il n'y aurait pas avantage à adapter, à la production de la toxine staphylococcique, le milieu de culture récemment mis au point par G. Ramon pour l'élaboration de la toxine diphtérique, et qui lui a permis d'obtenir des toxines d'un titre extrêmement élevé.

Voici la préparation du milieu et le mode de production de la toxine :

A 1 litre d'eau, on ajoute 10 cent. cubes d'HCl et 225 grammes de panse de porc fraîche. Il est utile de prendre 5 à 6 panses finement hachées pour obtenir une composition constante. On porte au bain-marie à 45° pendant deux heures ; on ajoute ensuite 325 grammes de viande de veau de première qualité, également hachée. On brasse le mélange et on le laisse à la température du laboratoire (15° à 18°) pendant une vingtaine d'heures. On arrête alors la digestion par chauffage à 100°. On filtre sur étamine, puis on amène au pH 6,8-7,0 au moyen de lessive de soude. On chauffe à nouveau à 100° pendant vingt minutes ; on filtre sur papier Joseph ; on répartit dans des fioles d'Erlenmeyer à deux tubulures et on stérilise vingt à vingt-cinq minutes à 100°.

Dans un tel milieu, après ensemencement d'une souche de staphylocoques hémolytiques et passage d'un faible courant d'air à 20 p. 100 de CO², on obtient une bonne toxine staphylococcique.

Le milieu décrit, que nous dénommerons, pour la commodité, milieu N, présente-t-il une supériorité sur le milieu de Walbum ?

EXPÉRIENCE III. — *Comparaison entre la production de toxine dans le milieu de Walbum (nos 1, 2, 3, 4 et 5) et dans le milieu N (nos 5, 6, 7 et 8).*

Après deux jours de culture :

DILUTIONS DE LA TOXINE						
	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01
<i>Milieu W.</i>						
1	—	—	—	—	—	—
2	++	++++	+	—	—	—
3	+++	++++	+	—	—	—
4	++++	++++	+++	+	—	—
<i>Milieu N.</i>						
5	++++	++++	++++	++++	++++	++++
6	++++	++++	++++	++++	++++	++++
7	++++	++++	++++	++++	++++	++++
8	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Après six jours de culture :

DILUTIONS DE LA TOXINE									
	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001
<i>Milieu W.</i>									
3	++++	++++	++++	++++	++++	+	—	—	—
4	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
<i>Milieu N.</i>									
7	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+

Les maximums atteints (huitième jour) ont été : pour les milieux de Walbum : 0,005 et 0,002; pour les milieux N : 0,001 et 0,0005.

Voici encore un autre exemple comparatif :

EXPÉRIENCE IV. — Comparaison entre la production de toxine dans le milieu W et dans le milieu N.

Après trois jours :

	DILUTIONS DE LA TOXINE					
	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01
<i>Milieu W.</i>						
1	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	—	—	—
3	—	—	—	—	—	—
4	++	—	+	—	—	—
<i>Milieu N.</i>						
5	++++	++++	++++	++++	+	—
6	++++	++++	++++	++	+++	—
7	++++	++++	++	+	+	—
8	++++	++++	++++	+++	++	—

Après huit jours de culture :

	DILUTIONS DE LA TOXINE								
	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001
<i>Milieu W.</i>									
1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	—	—
3	++++	++++	+++	—	—	—	—	—	—
4	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—
<i>Milieu N.</i>									
5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—
6	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++
7 (Infecté)	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
8	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Il ressort des expériences III et IV, et d'autres du même genre exécutées au cours de ce travail, que le bouillon N se prête le mieux à la production de la toxine staphylococcique; dans un tel bouillon, la toxine apparaît plus rapidement et

l'hémolysine atteint un taux plus élevé que dans les autres milieux essayés par nous.

Toutefois, il faut reconnaître que la production de toxine staphylococcique est délicate; aussi avons-nous entrepris quelques essais en vue de régulariser cette production.

Nous avons d'abord recherché si l'addition de sels tampons au milieu N, tels qu'on les trouve dans le milieu W, apporte une amélioration dans les résultats.

Le milieu N est donc modifié comme suit : avant l'ajustement au pH, on ajoute : phosphate acide de potasse : 0,02 p. 100; sulfate de Mg: 0,003 p. 100.

EXPÉRIENCE V. — *Comparaison de la production de toxine élaborée dans le milieu N, le milieu N modifié, et le milieu T (témoin).*

Souches : 30 et 32; passage d'air à 20 p. 100 de CO².

Flacon 1 : milieu N ensemencé avec souche 30.

Flacon 2 : milieu N ensemencé avec souche 32.

Flacon 3 : milieu T ajusté au pH 7,0; souche 30.

Flacon 4 : milieu T ajusté au pH 8,0; souche 30.

Flacon 5 : milieu N modifié, souche 30.

Flacon 6 : milieu N modifié, souche 32.

Après quatre jours de culture :

		DILUTIONS DE LA TOXINE						
		0,05	0,25	0,1	0,05	0,0025	0,001	0,0005
<i>Milieu N.</i>								
1		+++++	+++++	+++++	+++++	++	—	—
2		+++++	+++++	+++++	+++++	+++	+	—
<i>Milieu T.</i>								
3		—	—	—	—	—	—	—
4		+++++	++	+	—	—	—	—
<i>Milieu N modifié.</i>								
5		+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+	—
6		+++++	+++++	+++++	+++++	+++	—	+

Après sept jours de culture :

DILUTIONS DE LA TOXINE									
	0,05	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001
<i>Milieu N.</i>									
1	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+	—	—	—
2	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	—	—	—
<i>Milieu T.</i>									
3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4	++	++	—	—	—	—	—	—	—
<i>Milieu N'.</i>									
5	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	—	—	—
6	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	—	—	—

Après dix jours de culture :

DILUTIONS DE LA TOXINE				
	0,05	0,025	0,01	0,005
<i>Milieu N.</i>				
1	+++++	+++++	+	—
2	+++++	+++++	—	—
<i>Milieu T.</i>				
3	—	—	—	—
4	—	—	—	—
<i>Milieu N'.</i>				
5	+++	+++	—	—
6	++	—	—	—

L'addition du phosphate acide de potasse et du sulfate de magnésium ne modifie pas la production de toxine.

L'opportunité de la présence ou de l'absence de sucres dans les bouillons de culture est controversée; Walbum, J. Parker et d'autres insistent sur la nécessité d'écarter toute trace de sucre dans les bouillons servant à la préparation de la toxine staphylococcique; le bouillon Martin, qui sert à la production

de la toxine diphtérique, est débarrassé du glucose par digestion à 37°. Or, Ramon a montré que l'addition d'une petite quantité de glucose au bouillon, loin de nuire à l'élaboration de la toxine diphtérique, la favorise notablement.

Nous avons donc recherché l'influence du glucose sur la production de toxine staphylococcique.

EXPÉRIENCE VI. — Montrant l'action favorable du glucose ajouté au milieu N dans la proportion de 1 p. 1.000.

Après quatre jours de culture :

[illegible]

Déterminons maintenant la quantité optima de glucose à ajouter.

EXPÉRIENCE VII. — *Montrant le taux optima de glucose à ajouter au bouillon N.*

A cinq flacons de bouillon N, nous ajoutons respectivement 0,5, 1, 1,5 et 2,5 p. 1.000 de glucose. Deux flacons du même bouillon, sans sucre, servent de témoins. Culture en atmosphère chargée de CO²; souche n° 30.

Après cinq jours de culture:

[illegible]

Après neuf jours de culture :

	DILUTIONS DE LA TOXINE				
	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001
1	+++++	+++++	+++++	+++++	++
2	+++++	+++++	+++++	+++++	++
3	++++	++	—	—	—
4	++++	+++	+	—	—
5	+++++	++++	—	—	—
6	+++++	+++++	++	—	—

Cette expérience montre nettement que, loin de contrarier l'élaboration de la toxine au sein du milieu, l'addition de 1 p. 1.000 de glucose la favorise, comme dans la production de la toxine diphtérique.

Pouvons-nous espérer améliorer encore la production de toxine et élever son titre hémolytique ?

Signalons que, dans un lot de flaconsensemencés de staphylocoques, la production de la toxine varie assez notablement d'un flacon à l'autre, tant dans la vitesse d'apparition du poison que dans le taux maximum atteint. Nous verrons plus loin quels résultats pratiques on peut tirer de cette observation.

A la question des différences entre la production de toxine se rattachent les modifications du pH.

Burnet a bien montré l'importance du pH du bouillon. Inversement, nous avons recherché s'il y a une relation entre le pH terminal d'une toxine et son pouvoir toxique (pouvoir hémolytique).

EXPÉRIENCE VIII. — Comparaison entre le pH des différentes toxines et leur taux d'hémolysine.

MARQUE des toxines	TAUX D'HÉMOLYSINE au moment du pH	pH (méthode colorimétrique)
—	—	—
Toxine S3	0,005	6,6
Toxine S4	0,005	6,6
Toxine S5	0,001	6,8
Toxine S6	0,005	6,6
Toxine S1 A	Absence d'hémolysine.	6,8
Toxine S2 A	Absence d'hémolysine.	6,4
Toxine S2 B	Absence d'hémolysine.	6,4

MARQUE des toxines	TAUX D'HÉMOLYSINE au moment du pH	pH (méthode colorimétrique)
—	—	—
Toxine S12	0,01	6,7
Toxine S15	0,01	6,2
Toxine S16	0,001	6,7
Toxine S14	0,025	6,6
Toxine S19	0,0025	6,6

Il n'apparaît pas que le pH terminal, voisin en général du pH initial (6,8, 7,0), soit en rapport avec le taux d'hémolysine atteint.

B. — CHOIX D'UNE SOUCHE DE STAPHYLOCOQUES.

Beaucoup d'auteurs ont déjà relaté que toutes les souches de staphylocoques ne donnent pas de toxine, et que, parmi celles qui en donnent, on constate de grandes différences.

A titre indicatif, nous dirons que, sur une cinquantaine de souches étudiées, deux seulement ont permis la production d'une bonne toxine; l'une provenait d'un phlegmon (souche n° 3), l'autre d'un abcès thoracique [souche n° 37] (1); il s'agissait, dans les deux cas, de staphylocoques blancs.

Nous n'avons pas observé de relation entre la gravité de certaines affections à staphylocoques et le pouvoir toxigène du germe en cause.

De même, des souches isolées de pyodermites du chien ou du chat ou de phlegmons de la vache se sont montrées, en général, peu toxiques.

Les souches toxigènes conservent cette propriété pendant longtemps; ainsi, notre souche n° 3, isolée le 5 août 1932, a conservé jusqu'aujourd'hui, c'est-à-dire pendant quinze mois, son pouvoir toxique intact; il en est de même d'une autre souche (n° 37), isolée depuis sept mois, et dont le pouvoir toxigène n'a pas varié.

C. — ESSAIS EXPÉRIMENTAUX D'EXALTATION DU POUVOIR TOXIGÈNE D'UNE SOUCHE DE STAPHYLOCOQUES.

La recherche d'une bonne souche toxigène par sélection dépendant du hasard, nous avons tenté d'augmenter artifi-

(1) Ces 2 souches nous ont été remises par le Dr Millet, chef de Laboratoire de l'hôpital Saint-Jean, que nous remercions pour sa grande obligeance.

ciellement le pouvoir toxigène de notre souche n° 3 par passages successifs chez l'animal.

EXPÉRIENCE IX. — *Augmentation du pouvoir pathogène par passages de la souche n° 3 chez le lapin.*

La souche, au départ, tue le lapin à la dose de 2 c. c. 5 d'une émulsion à 1/10. Nous prenons, comme unité, un tube de gélose inclinée, ensemencé sur toute la surface et mis à l'étuve pendant vingt-quatre heures; l'émulsion des germes recueillis dans 10 cent. cubes d'eau physiologique constitue la solution au 1/10.

Chaque passage comporte une injection intraveineuse chez le lapin, une hémoculture sur gélose, et un repiquage d'une colonie sur un deuxième tube de gélose.

DATES	PASSAGES	VIRULENCE DE LA SOUCHE
28 octobre 1932.	1 ^{re}	1 c. c. 5 émuls. 1/10, le lapin meurt le 5 ^e jour.
8 novembre 1932.	2 ^e	10 c. c. 5 émuls. 1/10, le lapin meurt le 4 ^e jour.
15 novembre 1932.	3 ^e	2 cent. cubes émuls. 1/10, le lapin meurt le 2 ^e jour.
25 novembre 1932.	4 ^e	10 c. c. 5 émuls. 1/10, le lapin meurt en 24 heures.
		10 c. c. 25 émuls. 1/20, le lapin meurt le 5 ^e jour.

Nous arrêtons les passages pendant un mois; la souche est conservée à la glacière; au quatrième passage, le pouvoir hémolytique ne s'est pas modifié.

DATES	PASSAGES	VIRULENCE DE LA SOUCHE
5 janvier 1933.	5 ^e	10 c. c. 25 émuls. 1/20, le lapin meurt le 5 ^e jour.
11 janvier 1933.	6 ^e	10 c. c. 25 émuls. 1/20, le lapin meurt en 24 heures.
13 janvier 1933.	7 ^e	10 c. c. 2 émuls. 1/100, le lapin meurt le 4 ^e jour.
19 janvier 1933.	8 ^e	10 c. c. 3 émuls. 1/200, le lapin meurt le 4 ^e jour.
31 janvier 1933.	9 ^e	10 c. c. 3 émuls. 1/400, le lapin meurt le 3 ^e jour.
4 février 1933.	10 ^e	1 cent. cube émuls. 1/1.000, le lapin meurt en 24 heures.
7 février 1933.	11 ^e	10 c. c. 5 émuls. 1/1.000, le lapin meurt en 24 heures.

A cette date, la souche qui a subi onze passages en trois mois a vu sa virulence augmenter de près de 500 fois.

Voyons, maintenant, quel est le pouvoir hémolytique des souches isolées au cours de ces différents passages.

EXPÉRIENCE X. — *Pouvoir hémolytique des souches isolées au cours de passages successifs chez l'animal.*

Ensemencement sur milieu N.

Souches utilisées : S3 (souche originale).

S 19 du quatrième passage; S 28 du septième passage; S 30 du neuvième

passage; S 31 du dixième passage; S 32 du onzième passage. Témoin : S 33, anthrax.

Après neuf jours de culture :

	QUANTITÉS DE TOXINE					
	1,0	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025
Souche 3	+++	+++	++	—	—	—
Souche 19	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Souche 28	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Souche 30	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
Souche 31	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	++
Souche 32	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	—
Souche 33 (témoin).	+	—	—	—	—	—

Après treize jours de culture :

	DILUTIONS DE LA TOXINE				
	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025
Souche 3	+++	+++	++	—	—
Souche 19	+++++	+++++	+++++	+++++	+
Souche 28	+++++	+++++	+++++	+++++	+
Souche 30	+++++	+++++	+++++	+++++	+++
Souche 31	+++++	+++++	+++++	+++++	—
Souche 32	+++++	+++++	+++++	+++++	—

On voit donc par là, mise à part la souche originale qui a été plus lente à produire son hémolysine, que les passages successifs d'animal à animal n'augmentent pas le pouvoir toxigène de la souche, contrairement à la virulence. Virulence et pouvoir toxique sont deux propriétés distinctes, ainsi que G. Ramon et R. Debré l'ont encore récemment montré pour le bacille diphthérique. Nous en apportons une nouvelle confirmation avec le staphylocoque.

Malgré la stabilité que montre la propriété toxigène d'une souche de staphylocoques, on peut toutefois envisager la possibilité d'exaltation de ce pouvoir toxique par d'autres techniques.

Partant du fait que, dans une série de flacons se trouvant exactement dans les mêmes conditions et ensemencés avec une même quantité d'une même émulsion homogène de staphylo-

coques, certains de ces flacons montrent une production plus abondante et plus rapide de toxine, on peut se demander si, dans une *colonie* bien isolée de staphylocoques, il n'existe pas des germes doués différemment de propriétés toxiques. Cette hypothèse s'appuie sur la constatation aujourd'hui incontestée de colonies R et de colonies S, de virulence fort différente, existant dans une culture pure d'un germe donné.

Il nous paraît prématuré d'étayer cette hypothèse sur les quelques constatations préliminaires que nous avons relevées; nous pensons, toutefois, qu'il est possible d'arriver à une amélioration dans la production de toxine, par sélection *in vitro*.

EXPÉRIENCE XI. — On prépare d'abord une provision de bouillon N de façon à conserver ce facteur constant.

Douze Erlenmeyer sontensemencés avec la souche n° 42 (ancienne souche originale n° 3).

Après cinq jours de culture, les flacons 5, 7 et 8 donnent une hémolyse à 0.005; les autres sont manifestement moins avancés.

Premier passage : 3 flacons (n° 13, 14 et 15) sontensemencés avec 10 cent. cubes de la culture prélevée dans le n° 5. Après quatre jours de culture, les bouillons donnent respectivement comme hémolyse : n° 13 : 0.025; n° 14 : 0.0025; n° 15 : 0.001.

Deuxième passage : 3 flacons (n° 16, 17 et 18) sontensemencés avec le contenu du flacon n° 15; après sept jours, le flacon n° 18 donne une hémolysine titrant 0.001.

Troisième passage : 7 flacons (n° 19 à 25) renfermant 200 cent. cubes de bouillon N sontensemencés avec 10 cent. cubes du flacon n° 18.

Le sixième jour, les flacons 20, 22, 23, 24 et 25 titrent 0.0025, soit 5 bons développements sur 7.

Quatrième passage : 2 Fernbach (n° 26 et 27) de 750 cent. cubes de bouillon N sontensemencés avec 10 cent. cubes prélevés dans le flacon n° 23 (titre : 0.0025). Le troisième jour, leur titre est respectivement de 0.0025 et 0.005; le sixième jour il atteint 0.0005 et 0.001.

Cinquième passage : 5 Erlenmeyer (n° 28 à 32) sontensemencés avec la culture prélevée dans le Fernbach n° 27. Au cinquième jour, on obtient les résultats suivants :

Les flacons 28, 29, 30, 32, 33 montrent un titre hémolytique variant entre 0.001 et 0.0005; seul le flacon n° 31 est nettement au-dessous de ce taux.

Sixième passage : Du flacon n° 32 qui donne le taux le plus élevé d'hémolysine, nous ensemençons 6 Erlenmeyer (n° 34 à 39); les dosages des troisième et sixième jours donnent un taux d'hémolysine variant entre 0.001 et 0.0005.

Septième passage : Du flacon n° 34, on ensemence 3 Erlenmeyer, dont le taux d'hémolysine n'atteint pas des chiffres supérieurs à ceux mentionnés.

Il résulte de ces essais que les passages successifs *in vitro*, effectués dans de bonnes conditions de sélection, favorisent la production de l'hémolysine, en ce sens que cette production

devient, au cours des passages, plus *rapide* et plus *constante* ; mais il paraît difficile d'*élever* sensiblement le taux d'hémoly-sine d'une souche donnée ; ce taux semble fixe pour une souche sélectionnée. Par contre, il peut facilement tomber si les conditions de production deviennent défectueuses.

Avant d'examiner les propriétés de la toxine staphylococ-

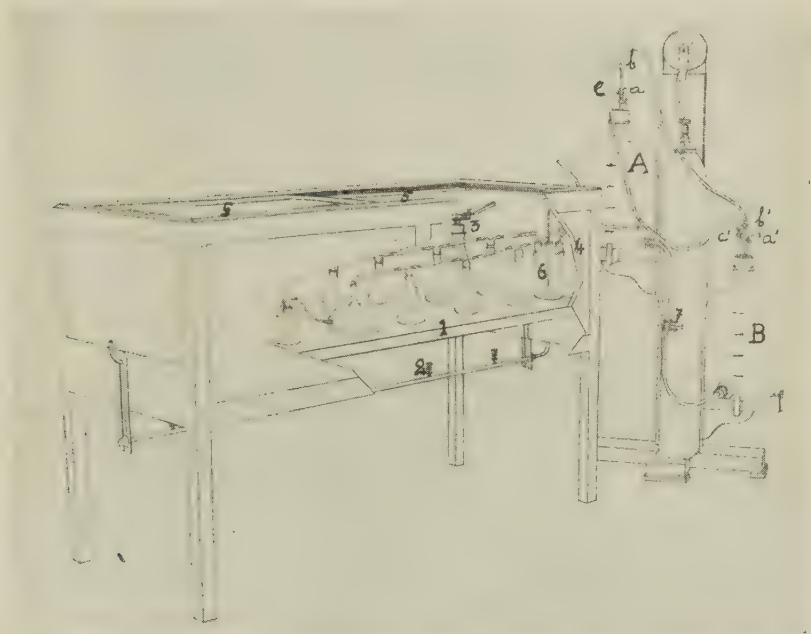


FIG. 1.

cique, nous croyons utile de décrire l'appareillage que nous employons pour la production de la toxine.

EXPÉRIENCE XII. — L'étuve utilisée est une étuve horizontale à un seul étage ; un réservoir plat, rempli d'eau, en constitue le fond (1). L'eau est chauffée par une rampe de becs-veilleuses (2). Grâce au grand volume d'eau (50 litres environ), on obtient une température bien régulière. Le réglage et la détermination de la température se font dans des récipients d'huile de vaseline (3) placés à l'intérieur de l'étuve. On obtient ainsi la température exacte des milieuxensemencés.

Les côtés de l'étuve sont à double paroi (4). La partie supérieure est composée de deux châssis vitrés à glissière (5) facilitant l'accès et la surveillance des ballons de culture.

Ceux-ci (Erlenmeyer à 2 tubulures ou Fernbach) sont reliés les uns aux autres par des ajutages en caoutchouc. Ils sont protégés de la contamination par deux bourres d'ouate placées à l'entrée et à la sortie des flacons.

Le mélange gazeux (air à 20 p. 100 de CO^2), dès son entrée dans l'étuve, passe d'abord par un flacon laveur (6) qui sert à observer le débit gazeux; puis il traverse la série des ballons, sort de l'étuve et s'échappe à l'extérieur du laboratoire par une cheminée.

Le mélange gazeux est préparé, puis envoyé à l'étuve de la manière suivante :

2 flacons de 20 litres, dont l'un est vide et l'autre rempli d'eau aux $\frac{4}{5}$ reposent sur deux consoles coulissant latéralement le long d'une potence; ils sont reliés à leur partie inférieure par un gros tuyau en caoutchouc muni d'un robinet ou d'un compresseur à vis, permettant le passage du liquide du flacon supérieur au flacon inférieur et son réglage (7).

Le goulot de chaque flacon est fermé par un bouchon percé de trois tubulures à robinet : la première communique avec l'extérieur; la deuxième est reliée à la bonbonne de CO^2 ; la troisième communique avec le flacon laveur de l'étuve.

Pour faciliter la description de l'opération, appelons A le flacon placé en haut et rempli aux $\frac{4}{5}$; a , b , c , les tubulures allant à l'extérieur, à la bonbonne et à l'étuve.

Marquons B le flacon inférieur vide et a' , b' , c' les tubulures de son orifice supérieur.

Supposons le flacon B rempli d'air à 20 p. 100 de CO^2 .

Ouvrons les tubulures a et b de A et remplissons le $\frac{1}{5}$ du flacon de CO^2 pur; grâce à la pression de la bonbonne, le CO^2 chasse l'air, et, vu sa densité, se maintient dans le récipient fermé en b et c , mais ouvert en a . Ouvrons maintenant la communication inférieure entre A et B et fermons a' et b' l'eau entre en B par le bas et chasse l'air qui s'engage par c' ouvert dans le flacon laveur. Pendant ce temps, le flacon A se remplit lentement d'air, et, lorsqu'il est vide, il renferme un mélange d'air ayant une teneur de 20 p. 100 de CO^2 ; il suffit alors d'intervertir la position des flacons A et B et de recommencer l'opération.

Une opération le matin et une le soir permettent le passage constant et régulier du mélange gazeux dans les milieux de culture.

IV. — Caractères de la toxine staphylococcique.

A. — POUVOIR HÉMOLYTIQUE.

Un des caractères de la toxine staphylococcique le plus facile à rechercher, c'est son pouvoir hémolytique. Rappelons que J. Denys et H. Vandeveldé ont, les premiers, observé le phénomène de l'hémolyse en examinant au microscope le gonflement, puis la lyse des globules rouges immergés dans la toxine.

Ce pouvoir hémolytique est d'autant plus marqué que la

toxine est plus concentrée, mais cela n'est pas rigoureusement vrai, ainsi que le prouve l'expérience suivante :

EXPÉRIENCE XIII. — Dans une série de tubes, portons des doses décroissantes de toxine en commençant par de fortes doses :

2 cent. cubes; 1 cent. cube; 0 c. c. 5; 0 c. c. 25; 0 c. c. 1; 0 c. c. 05; 0 c. c. 025
0 c. c. 01; 0 c. c. 005.

Ajoutons dans chaque tube 1 goutte de globules rouges de lapins lavés et dilués au tiers; amenons tous les tubes au volume de 2 cent. cubes par addition d'eau physiologique, puis portons à 37° et observons attentivement l'apparition de l'hémolyse. Au bout de quelques minutes, nous constatons que l'hémolyse débute en premier lieu dans le cinquième tube (0 c. c. 1 toxine), puis s'étend aux sixième et septième tubes, puis aux huitième et neuvième; à ce moment, le tube n° 3 (0 c. c. 5) n'est que partiellement hémolysé; les tubes n°s 1 et 2 ne s'hémo lysent pas.

Si l'on répète l'expérience en augmentant la quantité de globules, on constate que l'hémolyse débute encore dans le cinquième tube.

Il existe donc, dans le milieu, des substances qui s'opposent à l'hémolyse. Toutefois, les globules rouges non hémolysés sont touchés par la toxine; en effet, si on centrifuge les tubes n°s 1 et 2, et si on redissout le culot contenant les globules dans de l'eau physiologique, on observe leur lyse instantanée.

Cette propriété inhibitrice n'est pas spécifique pour la toxine; elle se retrouve dans le bouillon qui lui donne naissance (bouillon N); cette propriété du bouillon d'inhiber l'hémolyse permet de mieux mettre en évidence la sensibilité des globules mis en contact avec la toxine; en effet, on peut penser que, dans l'essai précédent, l'hémolyse rapide, qui se produit après suspension dans l'eau physiologique des globules « sensibilisés », est due à un reste de toxine libre; or, si on lave plusieurs fois ces globules avec du bouillon de façon à débarrasser le milieu de toute trace de toxine sans les hémolyser et si, ensuite, on les porte dans l'eau physiologique, ils s'hémo lysent immédiatement, preuve que la toxine les a précédemment touchés et qu'ils sont en puissance d'hémolyse.

Cette constatation est à rapprocher de celle qu'a faite à ce propos O. Gengou. Ce savant a montré que les globules rouges, mis en présence d'hémolysine staphylococcique à la température de 0°, n'hémo lysent pas mais absorbent de la toxine, car, si après centrifugations et lavages répétés en eau physiologique

à 0°, on les porte à la température du laboratoire, ils se lysent en quelques instants.

Notons encore que les substances inhibitrices de l'hémolyse staphylococcique n'ont aucune action sur d'autres substances hémolytiques, l'oléate de soude par exemple.

EXPÉRIENCE XIV. — Prenons une solution d'oléate de soude à 2 p. 100. Portons des dilutions décroissantes de cette solution dans des tubes et examinons le taux minimum d'hémolyse.

Refaisons le même essai en remplaçant l'eau physiologique de la solution par du bouillon N; l'hémolyse se produit sans aucune inhibition.

Madsen a montré que les globules rouges qui ont adsorbé de la tétanolysine par contact à basse température et que l'on traite ensuite à froid par du sérum antitoxique, restent intacts lorsqu'on les transporte à l'étuve à 37°.

Nous avons essayé de reprendre l'expérience avec de la toxine staphylococcique; malheureusement, nous n'avons pu confirmer entièrement l'observation de Gengou concernant la protection des globules rouges vis-à-vis de la toxine à 0°. Nos toxines staphylococciques diluées au 1/10, et au 1/100 attaquent les globules à 0, — 1°, même si le contact n'est que de deux à trois heures.

C. Dujarric de la Rivière et N. Kossovitch ont montré que des globules rouges mis préalablement en contact avec de l'anatoxine tétanique sont protégés contre l'action hémolytique de la toxine tétanique; par contre, les globules, mis en contact d'abord avec l'anatoxine, puis avec l'antitoxine tétanique, subissent, à 37°, l'hémolyse dans certaines conditions d'expériences.

Peut-on observer un phénomène analogue avec la toxine, l'antitoxine et l'anatoxine staphylococciques ?

EXPÉRIENCE XV. — Dans deux verres à pied, on mélange respectivement dans le premier, 2 c. c. 5 de globules rouges au tiers, 2 c. c. 5 d'eau physiologique et 0 c. c. 5 d'anatoxine staphylococcique provenant d'une toxine très active.

Dans le deuxième, on ajoute simplement à 2 c. c. 5 de globules rouges au tiers et 3 cent. cubes d'eau physiologique. On possède ainsi deux émulsions de globules rouges de même densité.

Après un contact de quatre heures à la température du laboratoire, les émulsions globulaires sont mises en présence d'une série de tubes renfermant des doses décroissantes de toxine.

	DILUTIONS DE LA TOXINE							
	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025	0,001	0,0005
Globules + anatoxine, III gouttes	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	+	—	—
Globules rouges, III gouttes.	+++++	+++++	+++++	+++++	++++	+	—	—

Il n'y a donc aucune différence entre les globules mis en contact préalable avec l'anatoxine, et les globules tels quels, vis-à-vis de la toxine.

D'autres essais, où la quantité d'anatoxine a été fortement augmentée et le temps de contact notablement prolongé, n'ont pas modifié nos résultats.

Les globules rouges, touchés par l'anatoxine, sont-ils plus sensibles vis-à-vis du sérum anti?

EXPÉRIENCE XVI. — On prépare d'abord trois verres à pied :

Dans le premier, on mélange 2 c. c. 5 de globules rouges au tiers + 2 c. c. 5 d'eau physiologique,

Dans le deuxième, on mélange 2 c. c. 5 de globules rouges au tiers + 0 c. c. 5 d'anatoxine; on laisse en contact pendant quatre heures à la température du laboratoire, puis on ajoute 2 cent. cubes de sérum antistaphylococcique; on laisse en contact vingt minutes.

Dans le troisième verre, on mélange 2 c. c. 5 de globules rouges au tiers, 2 c. c. 5 d'eau physiologique et 2 cent. cubes du même sérum anti; contact : vingt minutes.

Les trois mélanges sont portés ensuite respectivement dans une série de tubes, dilués successivement de moitié d'un tube à l'autre, et ramenés par l'eau physiologique à un volume commun. Ils sont portés à l'étuve à 37° et agités toutes les quinze minutes. Après deux heures d'étuve, on ne constate dans aucun tube une trace d'hémolyse.

Par contre, ce qui s'observe avec une netteté remarquable, c'est la fixation de l'anatoxine sur le sérum antistaphylococcique.

Si, en effet, on mélange en quantité convenable toxine et antitoxine staphylococciques et si, ensuite, on ajoute des globules rouges, ceux-ci ne sont pas hémolysés. Par contre, si on mélange préalablement sérum et anatoxine, et si, après contact d'une heure, on ajoute la toxine, les globules rouges amenés dans un tel mélange s'hémolysent rapidement, l'ana-

toxine ayant préalablement fixé le sérum anti, qui, dès lors, ne peut plus neutraliser la toxine.

Cette propriété, que nous avons mise en évidence il y a quelques années pour la toxine diphtérique, est très nette dans ce cas, grâce à l'action hémolytique de la toxine *in vitro*.

B. — POUVOIR LYTIQUE.

Le pouvoir lytique ne se manifeste pas seulement vis-à-vis des globules rouges. Denys et Vandeveldt ont montré que cette action s'exerce également sur les globules blancs (leucocidine) et même sur les hémotoblastes et les cellules nerveuses.

O. Gengou a récemment montré que cette action lytique s'observe, *in vitro*, sur les cellules hépatiques, rénales, spléniques, etc.

La toxine possède-t-elle les mêmes propriétés lytiques *in vivo*? et, s'il en est ainsi, cette lyse ne joue-t-elle pas son rôle dans la mort de l'animal lorsque la toxine est portée dans la circulation générale?

C'est pour répondre à ces questions que nous avons étudié l'anatomo-pathologie des lésions aiguës provoquées par la toxine staphylococcique (1).

ÉTUDE ANATOMO-PATHOLOGIQUE. — Nous nous sommes servis de toxines provoquant la mort d'un lapin de 2 kilogrammes à la dose de 1 cent. cube et même moins, administrées par voie veineuse.

LÉSIONS MACROSCOPIQUES CHEZ LE LAPIN. — Lorsque la mort a été rapide, l'autopsie peut ne montrer, à première vue, aucune lésion caractéristique; au contraire, lorsque le temps écoulé entre l'injection et la mort a été plus long (quelques heures), on voit assez régulièrement apparaître une péricardite séreuse; nous avons toutefois observé cette lésion trente minutes après l'injection d'une toxine particulièrement violente.

(1) Avec la collaboration du Dr E. Picard, chef de travaux au laboratoire d'anatomie pathologique de l'Université de Louvain.

Dans d'autres cas, nous avons observé un exsudat péritonéal accompagnant une péricardite intense.

Dans certains cas d'intoxication aiguë, nous avons relevé des suffusions hémorragiques dans le médiastin et sur la surface du rein. Enfin, on constate régulièrement l'hémolyse du sang prélevé immédiatement après la mort; cette hémolyse est plus ou moins intense, suivant le temps qui s'écoule entre l'injection et la mort de l'animal.

LÉSIONS MICROSCOPIQUES. — Les organes prélevés à l'autopsie, effectuée immédiatement après la mort, sont fixés au liquide de Zenker.

Au microscope, on retrouve généralement, dans chacun des organes prélevés, la disparition de la majeure partie des globules rouges du sang des veines; celles-ci apparaissent remplies d'une flaque de liquide homogène dans lequel persistent seulement quelques globules intacts.

La plupart des vaisseaux et capillaires sanguins sont en vasodilatation marquée.

Les lésions microscopiques du foie sont particulièrement intenses. Chez tous les lapins morts rapidement après une injection de toxine, la presque totalité des cellules hépatiques présentent une lyse complète de leur protoplasme, tandis que le noyau apparaît intact et les dimensions de la cellule inchangées. Il s'agit de toute évidence d'une hépatite toxique suraiguë ayant détruit tout le parenchyme de l'organe.

Les poumons présentent de larges foyers de congestion et de splénisation.

Le myocarde montre des lésions inconstantes; dans certains cas, on trouve des fibres présentant un aspect granuleux et hyperplasique à côté d'autres fibres indemnes; par contre, dans plusieurs cas d'intoxication aiguë, il n'a pas été possible de mettre en évidence des altérations caractéristiques.

Le péricarde est le siège d'un épaissement fibrineux en rapport avec l'exsudat péricardique, trouvé macroscopiquement.

Les reins sont le siège d'une néphrite épithéliale aiguë débutive, caractérisée par une tuméfaction trouble des tubes contournés. Ces lésions toxiques du rein sont beaucoup plus discrètes que celles des cellules hépatiques.

Le thymus, la rate et les ganglions lymphatiques ne montrent pas de lésions de leurs cellules, mais présentent un engorgement sanguin avec de nombreuses suffusions hémorragiques dans les interstices cellulaires.

En résumé, la toxine staphylococcique provoque *in vivo* des lésions importantes de nombreux organes, se manifestant par une destruction des protoplasmes cellulaires, destruction d'autant plus marquée que la cellule est plus délicate.

Ces lésions sont-elles responsables de la mort subite qui survient à la suite de l'injection intraveineuse?

L'examen physiologique va répondre à la question.

ACTION PHYSIOLOGIQUE DE LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE (1). — Dans l'aperçu historique de ce travail, nous avons relaté les expériences anciennes d'Arloing, en 1891, et de Rodet et Courmont, en 1892, sur l'action physiologique des toxines staphylococciques proprement dites; il s'agit cependant de cultures totales, non filtrées, le filtrat retenant, d'après ces auteurs, la plupart des substances nocives.

Dans ces conditions, ils observent, chez le chien injecté de toxine, une tendance à l'arrêt de la respiration en expiration, une augmentation de la pression sanguine, un affaiblissement du cœur avec chute de la température et apparition de convulsions.

TECHNIQUE. — Chez une série de lapins d'environ 2 à 2 kilogr. 5, nous enregistrons la respiration au moyen du pneumographe, et nous inscrivons l'activité cardiaque au moyen du manomètre métallique de Gad et au moyen de l'électrocardiographe. La pression artérielle est, en outre, enregistrée au manomètre à mercure.

Lorsque, chez des lapins ainsi préparés, on injecte, par voie jugulaire, une dose de 2 c. c. 5 de toxine staphylococcique ou lorsqu'on infuse lentement dans la veine jugulaire la même dose de toxine diluée dans du liquide physiologique, on observe, après quelques minutes, une chute progressive de la pression artérielle, qui se manifeste en même temps qu'une série de

(1) Avec la collaboration du professeur J. J. Bouckaert, Institut F. Heymans de Pharmacodynamie, Université de Gand.

troubles cardiaques : ceux-ci se caractérisent tout d'abord par un ralentissement cardiaque dont l'origine semble être sinu-

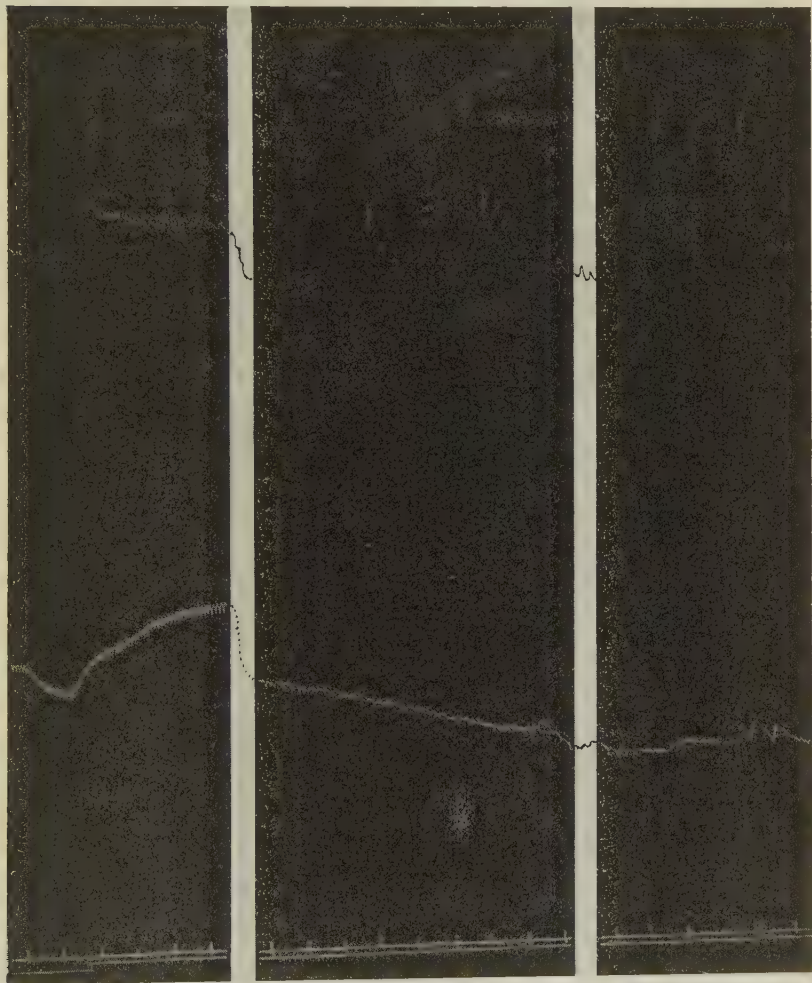


FIG. 2.

sale; ce ralentissement cardiaque s'accompagne d'une diminution progressive de l'amplitude cardiaque enregistrée au manomètre de Gad. Après un temps très court, ce ralentissement cardiaque est remplacé par de la fibrillation ventricu-

laire qui amène très rapidement la mort de l'animal. Les symptômes cardiaques, énumérés ci-dessus, s'observent aussi bien chez le lapin vagotonique que chez le lapin normal.

Pendant toute la période des troubles cardiaques, la respiration se maintient *normale*; les mouvements respiratoires s'observent même, pendant quelque temps encore, après l'arrêt du cœur : dans la période préterminale, ils sont entrecoupés de mouvements convulsifs.

EXPÉRIENCE XVII. — Lapin de 2 kilogr. 400. Injection dans la veine marginale de l'oreille de 2 c. c. 5 de toxine staphylococcique; on constate (fig. 2), la diminution passagère de la pression artérielle immédiatement après l'injection, due à l'action hypotensive des peptones contenues dans la toxine; puis, après un bref retour à la normale, on remarque la chute progressive de la pression artérielle, tandis que le rythme respiratoire reste normal; enfin, les convulsions respiratoires à la période anté-mortelle.

A la figure 3, on constate la diminution progressive de l'amplitude cardiaque tandis que la respiration se maintient normale.

EXPÉRIENCE XVIII. — Lapin de 1 kilogr. 900. Enregistrement de la pression au manomètre métallique et pneumogramme. Enregistrement à l'électrocardiographie.

Injection de 2 c. c. 5 de toxine staphylococcique dans la circulation sanguine (voir tableaux III et IV) :

En 1, immédiatement après l'injection.

En 2, électrocardiogramme en troisième dérivation.

En 5 et 6, section des deux nerfs pneumogastriques.

En 7, injection intraveineuse de sulfate d'atropine.

En 8, électrocardiogramme.

En 9, nouvelle injection intraveineuse de 2 c. c. 5 de toxine.

En 10 et 11, électrocardiogrammes.

Chez le chien, on observe les mêmes symptômes après injection d'une dose massive de toxine (environ 1 c. c. 5 de toxine par kilogramme d'animal).

L'injection intraveineuse détermine également, chez le chien, après quelques minutes, un ralentissement cardiaque bientôt remplacé par des phénomènes extrasystoliques qui font place eux-mêmes à la fibrillation ventriculaire.

EXPÉRIENCE XIX. — Chien de 18 kilogr. 500. Injection de 1 c. c. 5 de toxine par kilogramme de poids d'animal. Inscription de l'activité cardiaque et électrocardiogramme (fig. 6).

L'injection intraveineuse chez le chien d'une dose moindre de toxine (environ 0 c. c. 2 par kilogramme) ne détermine pas

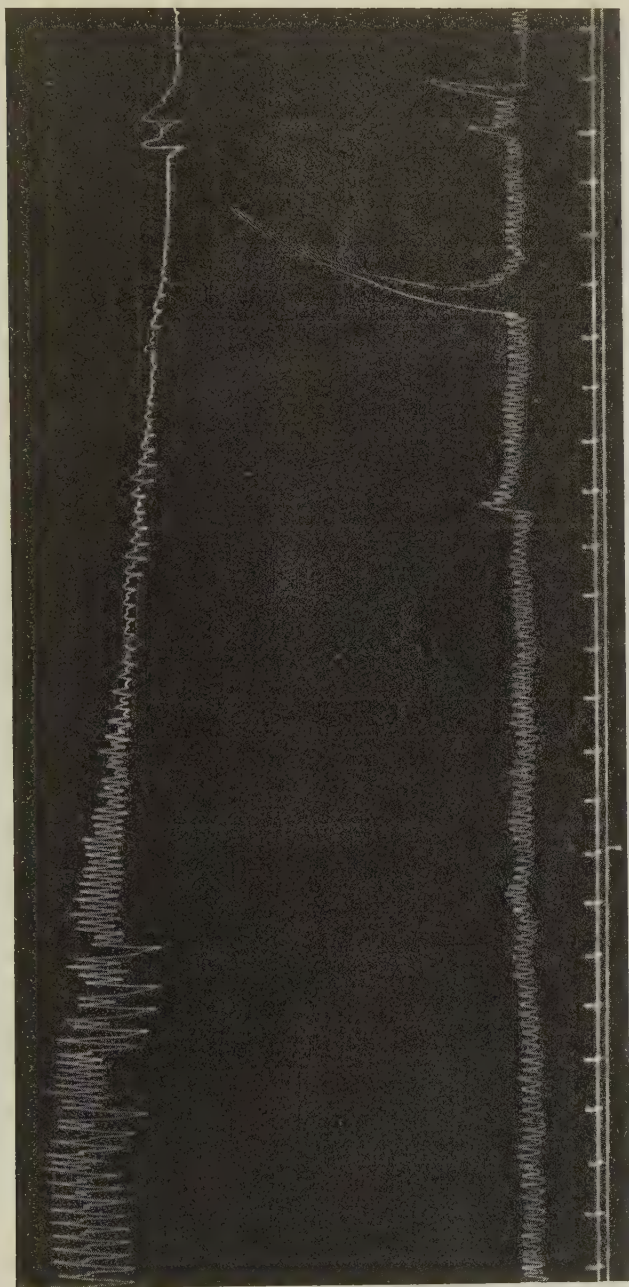


FIG. 3.

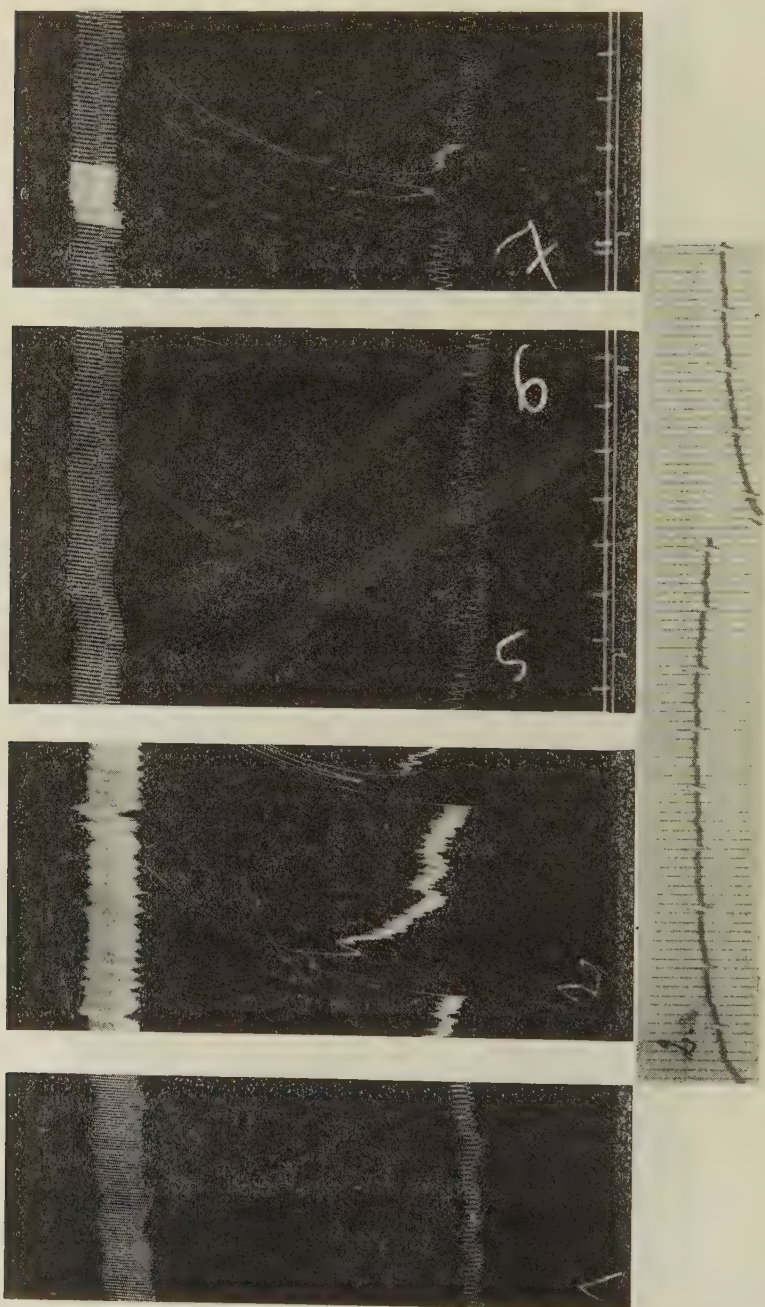


FIG. 4.

la mort immédiatement; toutefois, l'animal succombe après

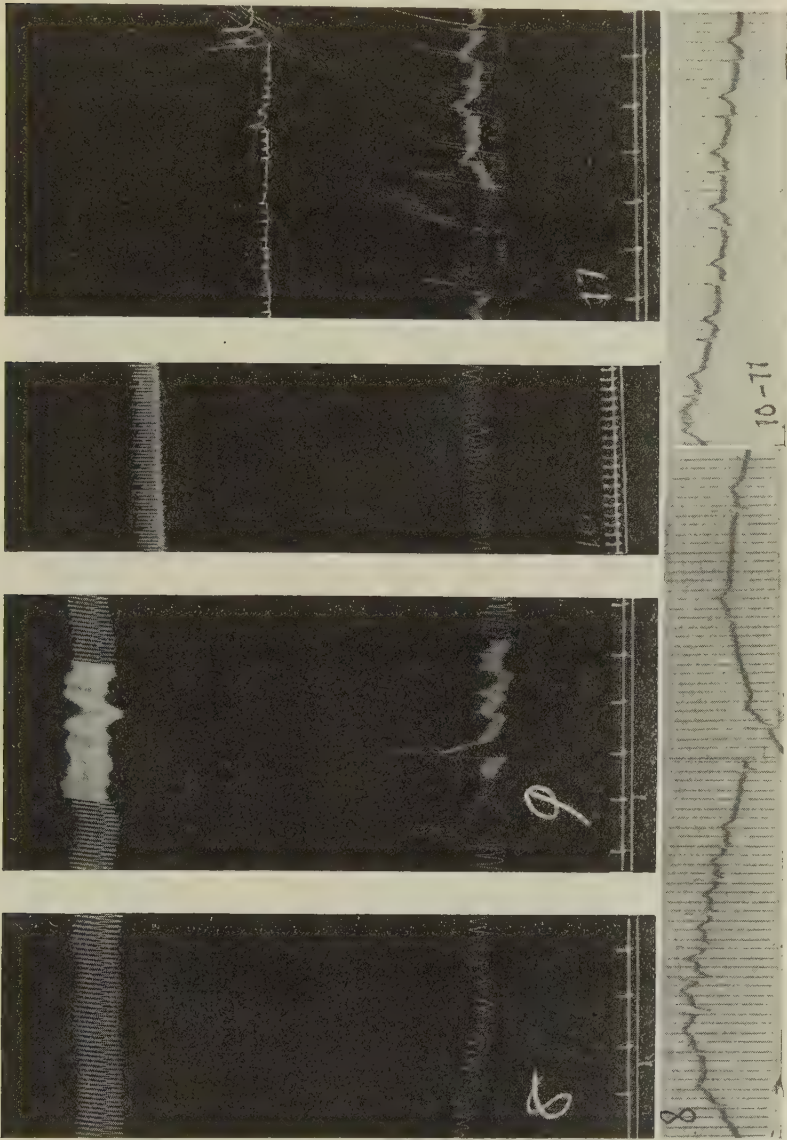


FIG. 5.

trois ou quatre jours, en présentant des symptômes tels que des troubles cardiaques, de l'ictère, des vomissements et des

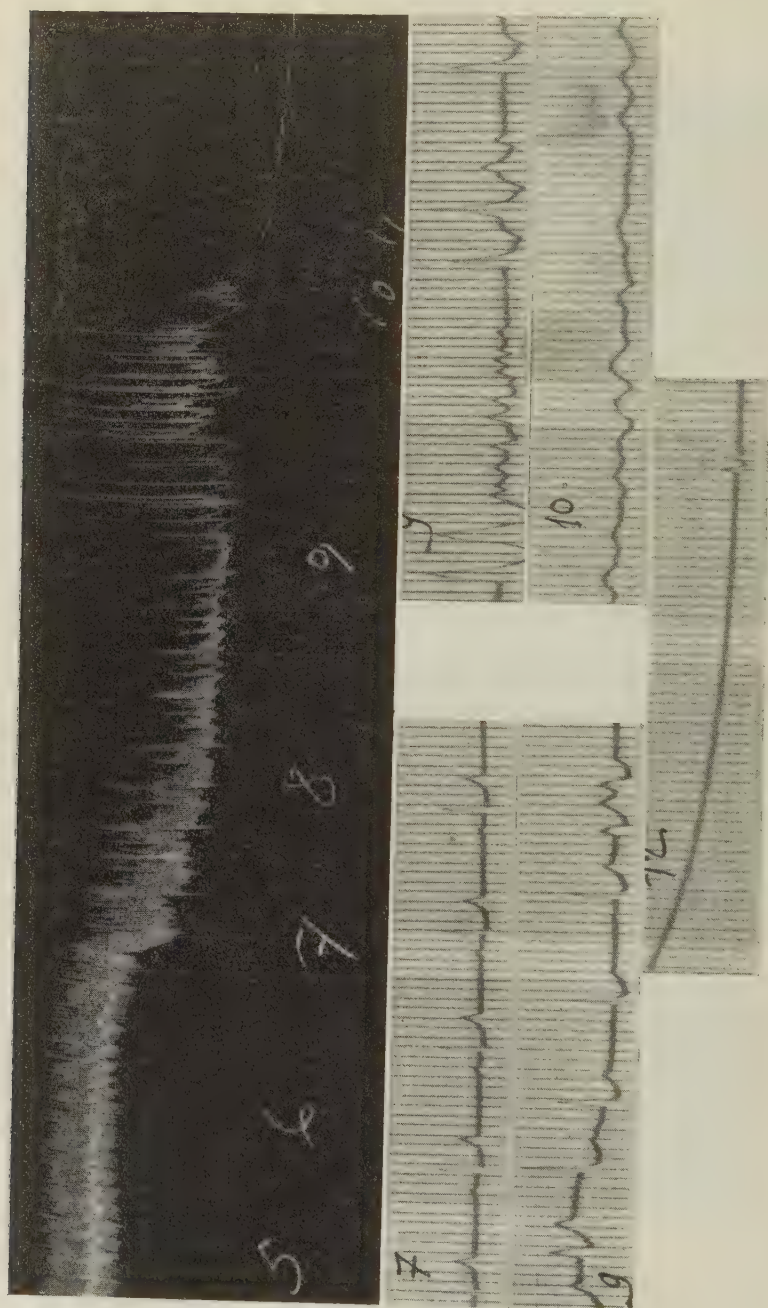


FIG. 6.

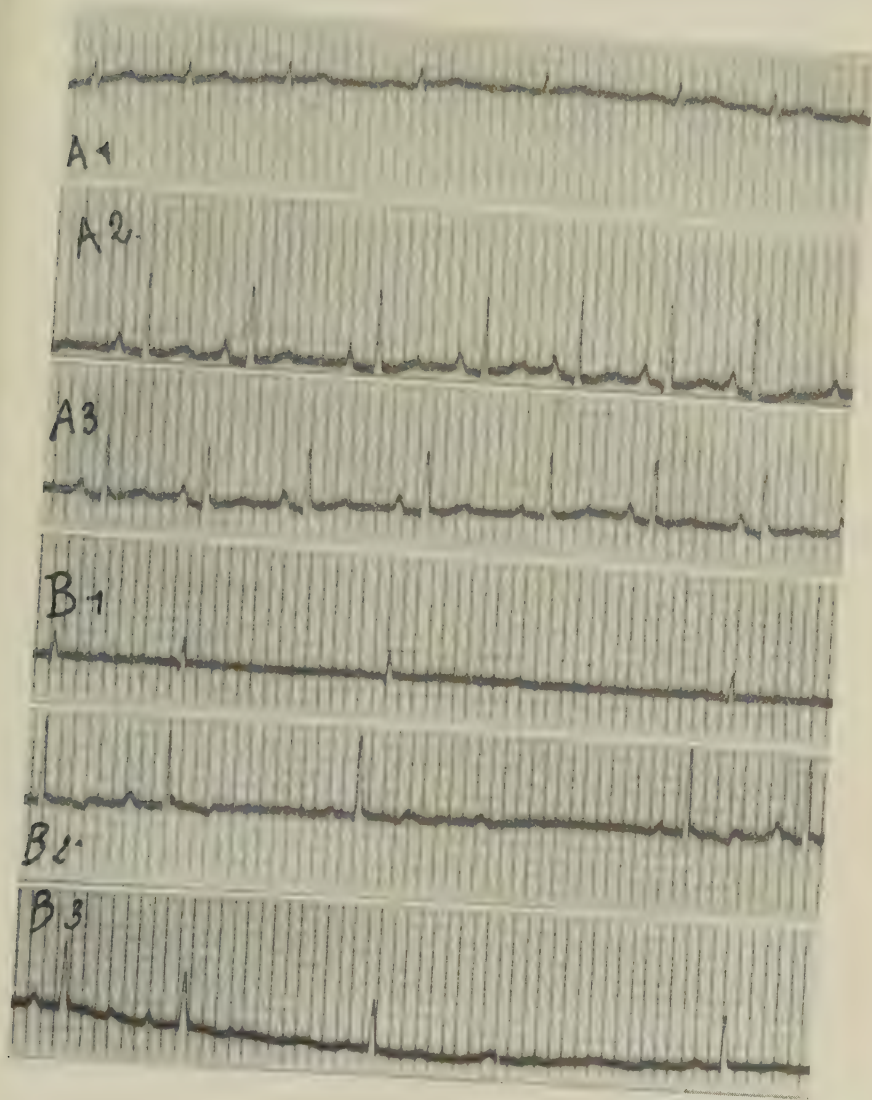


FIG. 7.

dans l'estomac, l'intestin, la rate, les reins, les poumons et la chambre antérieure de l'œil.

EXPÉRIENCE XX. — Chien de 10 kilogrammes (voir fig. 7 et 8).
En A. Electrocardiogramme en trois dérivations (A 1, 2 et 3).

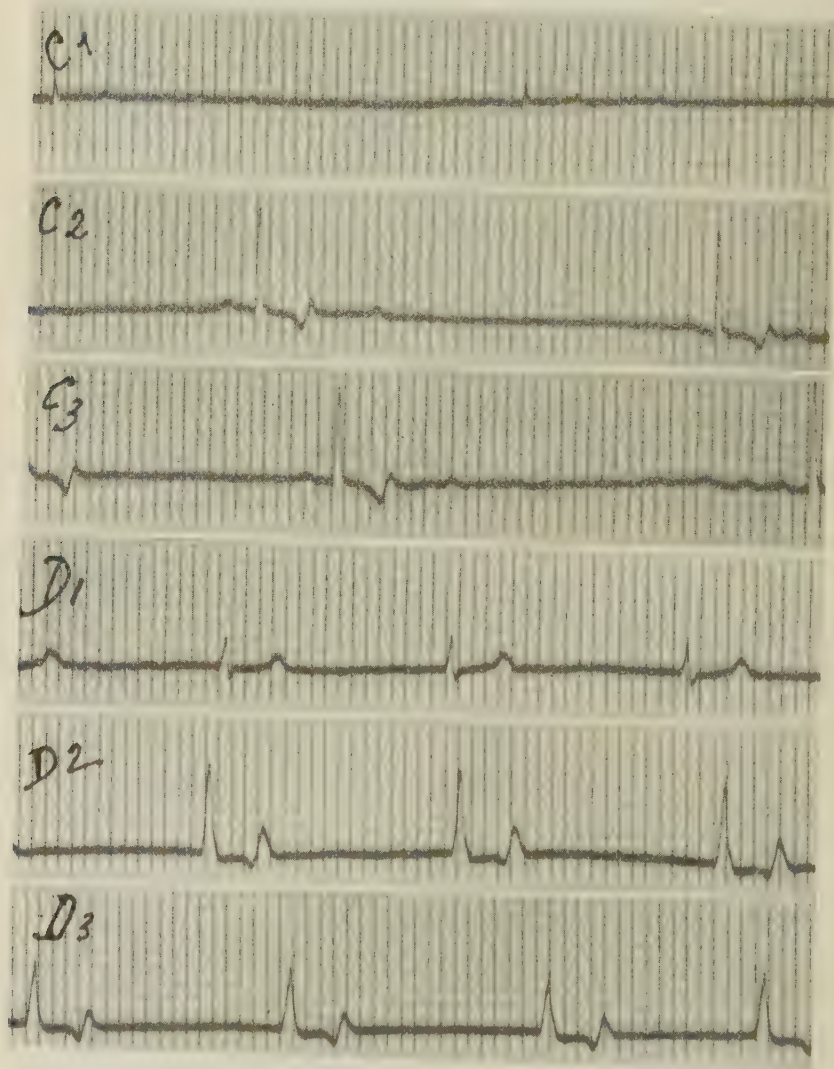


FIG. 8.

Injection intraveineuse de 2 cent. cubes de toxine.
Le lendemain de l'injection (10 heures a. m.), l'animal se trouve en état de forte dépression.
En B. Electrocardiogramme en trois dérivations. On constate, à ce

moment, des hémorragies dans la chambre antérieure de l'œil (aux 2 yeux).

A 18 heures, vomissements glaireux.

En C. Electrocardiogramme en trois dérivations.

Le surlendemain de l'injection, à 9 heures, l'animal est fortement déprimé, les hémorragies de l'œil sont très marquées.

En D (à 11 h. 30). Electrocardiogramme en trois dérivations.

L'animal meurt vers 15 heures. L'autopsie montre des hémorragies marquées dans le foie, les reins, l'intestin et le poulmon gauche.

En conclusion, si nous examinons les résultats des examens anatomo-pathologiques et ceux des épreuves physiologiques, nous constatons que l'injection intraveineuse d'une dose massive de toxine staphylococcique détermine la mort du lapin ou du chien en quelques minutes; la cause de cette mort semble se rapporter, avant tout, à une déficience cardiaque d'origine sinusale.

Lorsqu'on injecte par la voie veineuse une dose moindre de toxine, qui permet une survie de quelques jours, il semble que la mort soit due en outre à des troubles de fonctionnement de plusieurs organes, notamment du foie, du rein et des poulmons, ainsi que le prouvent à la fois les symptômes observés et les altérations profondes relevées au microscope.

ACTION NEUROTROPE DE LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE. — Nous avons recherché l'existence d'une action neurotrophe du poison staphylococcique. Rappelons d'abord l'action de la toxine *in vivo* sur les cellules des ganglions sympathiques. Mais l'action toxique sur le système nerveux se révèle par l'injection des émulsions staphylococciques. Si l'animal survit à l'injection, il présente très rapidement et constamment une paralysie du train postérieur qui remonte et qui tue l'animal en fort état d'amaigrissement (1).

On observe également ces paralysies chez certains lapins vaccinés à l'anatoxine staphylococcique et qui ont survécu à des doses mortelles d'émulsions.

Les paralysies relèvent-elles de la toxine staphylococcique?

A cet effet, nous avons effectué différentes expériences consistant à injecter, chez le lapin et chez le cobaye, des toxines partiellement atténuées de façon à pouvoir injecter une dose assez forte de poison.

(1) Notons toutefois que le lapin contracte des paralysies du train postérieur avec une extrême facilité.

EXPÉRIENCE XXI. — *a*) A 3 lapins, nous injectons dans la veine de l'oreille une toxine très active, mais partiellement atténuée par le formol, ce qui permet l'introduction de fortes doses.

Le premier lapin reçoit 7 c. c. 5 de toxine ; le deuxième, 6 c. c. 5 et le troisième, 5 cent. cubes. Les animaux, qui ont très bien supporté l'injection, n'ont montré, ni précocement ni tardivement, aucun symptôme de paralysie.

b) 4 lapins reçoivent en injection intraveineuse, 2 autres en injection péritonéale, de fortes doses de toxine partiellement neutralisée par du sérum antistaphylococcique ; les animaux n'ont présenté, à aucun moment, des symptômes paralytiques.

EXPÉRIENCE XXII. — *a*) 8 cobayes reçoivent, en injection sous-cutanée, au niveau de la cuisse droite, des doses croissantes (de 0 c. c. 05 à 1 c. c. 5) d'une toxine très active (d. m. h. : 0,0005) partiellement atténuée par addition de 5 p. 1.000 de formol et séjour à l'étuve pendant vingt-quatre heures.

Les animaux observés journellement n'ont présenté aucun symptôme de paralysie, même quarante-cinq jours après l'injection (1).

b) 6 cobayes reçoivent, dans la même région, des doses croissantes de 0 c. c. 2 à 1 cent. cube de toxine pure ; l'observation ne montre aucun symptôme de paralysie.

Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence une action neurotrope de la toxine staphylococcique ; nous continuons néanmoins nos recherches sur ce point.

ACTION DE LA TOXINE SUR LES PROTOZOAIRES. — L'action lytique si marquée de la toxine staphylococcique pour les cellules se manifeste-t-elle sur des protozoaires comme les trypanosomes ? L'expérience suivante répond à la question.

EXPÉRIENCE XXIII. — On recueille, dans du Ringer-Locke, le sang de quelques rats en pleine infection de trypanosomes. On centrifuge légèrement pour obtenir un liquide clair renfermant de nombreux parasites.

On ajoute à cette suspension des doses croissantes de toxine et on examine au microscope le temps et le degré de mobilité des parasites par comparaison avec ceux des tubes témoins.

Il résulte de différents essais effectués avec des doses croissantes de toxine jusqu'à la toxine pure, que les trypanosomes ne sont aucunement influencés dans le degré et la durée de leur mobilité par la toxine staphylococcique ; celle-ci paraît sans action sur eux.

Avant de terminer l'examen du pouvoir toxique, nous devons encore dire un mot de l'unicité de la toxine staphylococcique.

On sait que F. M. Burnet s'est attaché à ce problème ; pour

(1) Tout récemment (*C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114**, p. 361, 371), Travassos a des morts avec syndromes léthaniques par injection intracérébrale de toxine staphylococcique.

lui, l'unicité de la toxine staphylococcique est démontrée par le fait que les différentes propriétés (hémolytique, toxique) vont toujours de pair et qu'un antisérum, obtenu par la vaccination au moyen d'un filtrat staphylococcique, manifeste aussi bien son pouvoir vis-à-vis d'une propriété que d'une autre. Mentionnons que l'unicité avait été soutenue avant Burnet par M. Nicolle et Césari.

O. Gengou a apporté à cette question une preuve plus rigoureuse en faveur de l'unicité de la toxine en montrant qu'un filtrat staphylococcique, privé d'une de ses activités par contact avec l'élément vis-à-vis duquel il exerce cette activité, *perd, en même temps, ses autres propriétés.*

Il montre, par exemple, qu'un filtrat privé de son action hémolytique, par contact avec les globules rouges, perd, du fait même, son pouvoir leucocidique, son pouvoir toxique et *vice versa.*

J. Parker et A. Gunther ont remis tout le problème en question en démontrant que le pouvoir dermatotoxique, mis en évidence en 1924, par l'une d'elles, est différent du pouvoir toxique, hémolytique et leucocidique. Utilisant également la technique de l'épuisement, ces auteurs arrivent aux conclusions vantes :

1° Les filtrats stériles de certaines souches hémotoxiques de staphylocoques ont diverses propriétés toxiques, dont les plus importantes sont les propriétés hémotoxique, nécrotique, leucocidique et léthale.

2° L'action nécrotique semble provenir d'un élément du filtrat, différent de l'élément hémotoxique ou de l'élément leucocidique.

Plus récemment Burky, étudiant le filtrat de certaines souches de staphylocoques, dissocie nettement les propriétés hémolytiques et toxiques. Pour lui, les filtrats peu hémolytiques se montrent très toxiques et *vice-versa.*

Nous avons étudié cette question par les expériences suivantes.

EXPÉRIENCE XXIV. — On mélange dans un verre à pied 10 cent. cubes de globules rouges purs, 9 cent. cubes d'eau physiologique et 1 cent. cube de toxine (S16 ; d. m. h. = 0,001). Ce mélange est le mélange A et renferme de la toxine diluée à 1/20.

On dilue également 1 cent. cube de la même toxine dans 19 cent. cubes d'eau physiologique, ce qui constitue le mélange B.

Le culot de centrifugation de A, formé de stromas globulaires, est additionné d'eau physiologique en même proportion que A et constitue le mélange C.

	DILUTIONS DU MÉLANGE C							
	0.5	0.25	0.12	0.06	0.03	0.015	0.007	0.0035
	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—
Mélange C.	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—

La recherche du pouvoir nécrotique de A et B donne les résultats suivants :

	DILUTIONS DES MÉLANGES						
	0,2	0.1	0,05	0,025	0,012	0,006	0.003
	—	—	—	—	—	—	—
Mélange A.	Nécrose.	Nécrose.	Nécrose.	Nécrose.	Nécrose	Nécrose.	Nécrose.
Mélange B.	Nécrose.	Nécrose.	Nécrose.	Nécrose.	Nécrose	Nécrose.	Nécrose.

Les stromas lavés, formant le mélange C, sont laissés la nuit dans la glacière; ils sont centrifugés le lendemain et lavés deux fois, puis soumis à l'épreuve hémolytique dans la même manière que précédemment.

	DILUTIONS DU MÉLANGE C						
	0.02	0,02.	0.12	0.05	0.03	0.015	0,007
	++++	++++	++++	++++	+++	++++	—
Mélange C.	++++	++++	++++	++++	+++	++++	—

Ces stromas exercent donc encore un pouvoir hémolytique vis-à-vis des globules rouges. Injectés dans le derme d'un lapin aux dilutions suivantes, ils provoquent également la nécrose cutanée.

	DILUTIONS DU MÉLANGE C				
	0.2	0.1	0.05	0.025	0.012
	Nécrose.	Nécrose.	Nécrose.	Nécrose.	Nécrose.
Mélange C.	Nécrose.	Nécrose.	Nécrose.	Nécrose.	Nécrose.

Cette double expérience montre que la disparition élective du pouvoir hémolytique d'un filtrat entraîne la disparition du pouvoir nécrotique. Inversement, la conservation élective de ce pouvoir (fixation de l'hémolysine sur les stromas) comporte le maintien des propriétés nécrotiques; de sorte que nous sommes amené à admettre, avec P. Burnet et O. Gengou, l'unicité de la toxine staphylococcique.

*
* *

Nous avons vu précédemment que l'injection d'une dose appropriée de toxine staphylococcique dans les veines d'un lapin tue l'animal en quelques minutes, et que cette action relève en premier lieu d'une déficience cardiaque.

Peut-on sensibiliser ou désensibiliser l'animal contre le poison par une injection préparante?

EXPÉRIENCE XXVI. — Un lapin reçoit, en injection intraveineuse, 1 c. c. 5 d'une toxine dont la d. m. m. est environ 10 cent. cubes (mort en vingt-cinq minutes). Une heure et demie après, il reçoit 10 cent. cubes de la même toxine et meurt en trente-cinq minutes environ; l'injection préalable n'a donc pas modifié l'action de la dose léthale de toxine.

EXPÉRIENCE XXVII. — Un lapin reçoit en injection intraveineuse 1 c. c. 5 de toxine dont la d. m. m. est de 10 cent. cubes (mort en vingt-cinq minutes). Une heure et demie après, il reçoit 5 cent. cubes de la même toxine, puis, cinq heures et demie après la première injection, il reçoit encore 3 c. c. 5, soit 10 c. c. 5 au total. Après la troisième injection, l'animal est fortement déprimé; il est sacrifié peu de temps avant la mort pour examen anatomo-pathologique des organes.

On peut donc dire que la toxine, injectée préalablement à petites doses, n'influence pas l'action léthale de la dose principale ni dans le sens d'une diminution ni dans le sens d'une augmentation du pouvoir toxique.

V. — Action de différentes substances sur la toxine staphylococcique.

Nous examinerons maintenant l'action de certains corps chimiques sur le poison élaboré par le staphylocoque.

Nous nous sommes servi dans tous ces essais de toxines ayant un pouvoir hémolytique voisin de 0.001.

La technique générale a consisté à examiner la diminution,

voire la disparition du pouvoir hémolytique de la toxine sous l'action du composé chimique.

Les variations de ce pouvoir hémolytique traduisent les variations correspondantes du pouvoir toxique total, ainsi que nous l'avons montré antérieurement et ainsi que nous l'avons contrôlé au cours de ces essais.

ACTION DES ACIDES FORTS SUR LA TOXINE STAPHYLOCOCCIQUE.

I. Prenons comme type l'*acide sulfurique*. — Après vingt-quatre heures de contact à l'étuve à 37°, l'acide sulfurique, ajouté dans la proportion de 5 p. 100 et plus, détruit complètement la toxine; le pouvoir hémolytique d'un tel mélange est recherché après que le *pH* du milieu a été ramené au *pH* primitif du filtrat.

Les mélanges renfermant 1 p. 100 et 0,5 p. 100 d'acide ne sont que partiellement détruits, même après vingt-quatre heures de contact à 37°.

A la température du laboratoire, l'action de l'acide est plus faible; à la concentration de 5 p. 100 dans la toxine, l'acide ne la détruit que partiellement après vingt-quatre heures.

A ces fortes concentrations, la vitesse d'action de l'acide est assez grande. A 5 p. 100, et à la température de 37°, la destruction est déjà appréciable après trente minutes, elle est quasi-complète après deux heures, totale après seize à dix-huit heures.

Une toxine qui a perdu tout son pouvoir hémolytique par action de l'acide ne possède plus de pouvoir toxique: c'est ainsi qu'un lapin ayant reçu, en injection intraveineuse, 5 cent. cubes de toxine traitée par l'acide, puis neutralisée, résiste parfaitement, tandis qu'un témoin ayant reçu 1 cent. cube de la même toxine succombe en quelques secondes.

La toxine staphylococcique se comporte-t-elle vis-à-vis des acides comme la toxine diphtérique (1)?

(1) Certains auteurs ont montré que les acides, même à doses faibles, inactivent la toxine diphtérique sans l'altérer, car la neutralisation fait réapparaître sa toxicité. De Potter (*Bull. Ac. Roy. de Méd. de Belg.*, 1923, p. 394) montre que l'HCl neutralise le pouvoir toxique de la toxine diphtérique lorsque le mélange est injecté sous la peau, mais le fait que les animaux meurent d'intoxication diphtérique après l'injection intraveineuse de toxine acide prouve que la toxine n'est pas détruite par l'acide. Les quantités d'acide utilisées par F. De Potter sont assez faibles; ses résultats n'ont pas pu nous servir dans un essai comparatif.

Pour rechercher une similitude éventuelle de comportement, nous avons traité simultanément de la toxine staphylococcique et de la toxine diphtérique par H^2SO^4 ajouté en proportion de 5 et 1 p. 100 de toxine.

Après vingt-quatre heures de contact à 37° et neutralisation des toxines, ramenées à leur *pH* primitif, nous avons recherché pour la première le pouvoir hémolytique et, pour la seconde, le pouvoir mortel sur cobaye.

EXPÉRIENCE XXVIII.

I. — Toxine staphylococcique.

	0,5	0,25	0,1	0,05	0,025	0,01	0,005	0,0025
Toxine acidifiée à 5 p. 100.	—	—	—	—	—	—	—	—
Toxine acidifiée à 1 p. 100.	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+
Toxine témoin.	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

On constate la destruction totale de la toxine acidifiée à 5 p. 100 et la destruction faible de la toxine acidifiée à 1 p. 100 par H^2SO^7 .

II. — Toxine diphtérique.

DOSE INJECTÉE en centimètre cube	SORT DES ANIMAUX
<i>Mélange toxine acidifiée à 5 p. 100.</i>	
1.	Survit le 4 ^e jour (escarre).
0,4.	Survit le 4 ^e jour (légère escarre).
0,01.	Survit sans escarre.
0,001.	Survit sans escarre.
<i>Mélange toxine acidifiée à 1 p. 100.</i>	
1.	Meurt le lendemain de l'injection.
0,4.	Meurt le lendemain de l'injection.
0,01.	Meurt le 2 ^e jour après l'injection.
0,001.	Survit le 4 ^e jour (escarre).
Témoin dose minima mortelle : 0,001.	

On voit que les deux toxines qui prennent naissance dans un bouillon de composition sensiblement identique se comportent semblablement vis-à-vis d'un acide; il est probable que le

bouillon joue un grand rôle dans la résistance d'une toxine vis-à-vis des agents destructeurs.

Nous avons enfin recherché l'action prolongée de faibles doses d'acide fort sur la toxine staphylococcique. Celle-ci, acidifiée à 5 p. 1.000 par H^2SO_4 , a perdu complètement son pouvoir toxique après quatre jours d'étuve à 37°.

II. *Acide chlorhydrique.* — L'acide chlorhydrique, utilisé à la même concentration que l'acide sulfurique, agit de la même façon que celui-ci sur la toxine staphylococcique : destruction totale de la toxine acidifiée à 5 p. 100 par HCl après vingt-quatre heures à 37°; destruction partielle, dans les mêmes conditions, à 1 p. 100 d'HCl.

III. *Action des acides faibles.* — 1° *Acide acétique.* — Même acidifiée à 5 p. 100 par l'acide acétique, la toxine n'a pas perdu son pouvoir toxique après vingt-quatre heures à 37°.

2° *Action prolongée des acides faibles, à faible concentration.* — La toxine acidifiée à 5 p. 100 et à 1 p. 100 par les acides tartrique et lactique ne subit aucune modification de son pouvoir hémolytique, même après dix jours à 37°.

Dans les mêmes conditions, la toxine acidifiée par l'acide oxalique montre, après quatre jours à 37°, une destruction partielle de son pouvoir hémolytique.

3° *Action des acides salicylique, benzoïque et β -oxynaphthoïque.* — Nous rangeons ces trois corps dans une catégorie spéciale, parce que H. Vincent les fait rentrer dans le groupe dénommé par lui « corps cryptotoxiques ».

a) *Acide benzoïque.* — Deux flacons renfermant 50 cent. cubes de toxine staphylococcique sont additionnés d'acide benzoïque, le premier dans la proportion de 4 p. 1.000, le second dans la proportion de 1 p. 1.000; les mélanges sont laissés à l'étuve à 37°.

Après quatre jours, le pouvoir toxique du mélange à 4 p. 1.000 tombe de 0,001 à 0,003; après seize jours, il atteint 0,05 et, au vingt-troisième jour, il a complètement disparu.

Le mélange à 1 p. 1.000 d'acide benzoïque perd plus lentement son pouvoir hémolytique; il faut quarante-trois jours d'étuve pour le faire disparaître complètement; notons que la même toxine, mise à l'étuve, en même temps, a perdu partiellement son pouvoir hémolytique qui est passé de 0,001 à 0,05.

b) *Acide salicylique.* — L'acide salicylique ajouté à la toxine staphylococcique aux mêmes doses que l'acide benzoïque (4 p. 1.000 et 1 p. 1.000) agit à peu près de la même façon que celui-ci.

Le pouvoir hémolytique du mélange primitivement de 0,001 passe au cinquième jour à 0,003; au douzième jour à 0,01 et au vingtième jour il a complètement disparu. Son action de détoxification est donc légèrement supérieure à celle de l'acide benzoïque.

Le mélange à 1 p. 1.000 d'acide salicylique se comporte comme le mélange correspondant d'acide benzoïque et perd totalement son pouvoir toxique en quarante jours environ.

c) *Acide β -oxynaphthoïque*. — H. Vincent a montré que l'acide α -oxynaphthoïque est doué d'un pouvoir cryptotoxique spécial vis-à-vis de la toxine diphtérique. Dans l'impossibilité de nous procurer de l'acide α , nous avons utilisé son isomère β oxynaphthoïque sur la toxine staphylococcique.

La toxine est additionnée de ce produit à raison de 2,5 et 5 p. 1.000. Le mélange à 5 p. 1.000 perd entièrement sa toxicité en trois à cinq jours à la température de 37°. Le mélange à 2,5 p. 1.000 devient atoxique en dix à quinze jours. La toxine témoin garde au bout de ce temps son pouvoir toxique à peu près intact.

4° *Action des sels de quinine sur la toxine staphylococcique*. — Nous avons montré antérieurement, après Marie, que certains sels de quinine détruisent la toxine diphtérique. Le bichlorhydrate de quinine, par exemple, ajouté à la toxine diphtérique en proportion de 1 p. 100, détruit celle-ci en quelques jours. Les sels neutres (sulfate de quinine) sont sans action.

Nous avons ajouté du bichlorhydrate de quinine dans la toxine staphylococcique en proportion de 1 p. 100; 5 p. 1.000; 2,5 p. 1.000.

Au taux de 1 p. 100 et 5 p. 1.000, le complexe toxine-quinine a perdu, après quatre jours à 37°, tout son pouvoir toxique, le mélange renfermant 2,5 p. 1.000 perd son pouvoir toxique en une dizaine de jours.

5° *Action de l'oléate de soude*. — Étudié par de nombreux auteurs comme corps détoxiquant, l'oléate de soude agit-il également sur la toxine staphylococcique?

Prenons trois flacons : le premier, renfermant la toxine pure; le second, le bouillon N additionné d'oléate de soude à raison de 5 p. 10.000; le troisième, la toxine additionnée de la même quantité d'oléate.

Les trois flacons sont portés à l'étuve pendant trois jours. La recherche du pouvoir hémolytique donne les résultats suivants :

DILUTIONS	PRODUITS		
	Toxine pure (témoin)	Bouillon + oléate	Toxine + oléate
0,5	+++++	+++++	+++++
0,25	+++++	+++++	+++++
0,1	+++++	+++++	+++++
0,05	+++++	+++++	+++++
0,025	+++++	+++++	+++++
0,01	+++++	—	—
0,005	+++++	—	—
0,0025	+++++	—	—

On voit par ces essais l'action de l'oléate sur la toxine, partiellement cachée par le pouvoir hémolytique propre de l'oléate, ainsi que le montre le témoin : bouillon + oléate.

6° *Action de l'aldéhyde formique.* — Comme d'autres auteurs l'ont déjà observé, l'aldéhyde formique agit sur la toxine staphylococcique en la rendant atoxique.

Avec les toxines préparées par nous à partir du bouillon N, des taux de 1 à 2 p. 1.000 n'ont, pour ainsi dire, aucune action marquée sur la toxine.

La transformation en corps atoxique est encore très lente lorsque le formol est ajouté à raison de 3 à 4 p. 1.000. A des taux de 5 et 6 p. 1.000, la toxine perd son pouvoir toxique en cinq à quinze jours.

Quel est le mécanisme d'action de ces différents corps?

Pour certains d'entre eux, possédant une fonction acide, nous nous sommes demandé si ce n'est pas uniquement cette fonction qui intervient. Nous ne le pensons pas. En effet, voici le pH de différents complexes atoxiques.

Si on compare ces différents pH à ceux des toxines (voir tableau VIII), on peut en inférer que ce n'est pas le pH qui joue un rôle dans le processus de détoxification.

1) Anatoxine, n° S17.	$pH = 5,2$
Anatoxine, n° S19	$pH = 6,4$
Anatoxine, n° S16	$pH = 5,5$
2) Toxine Quinine à 1 p. 100.	$pH = 7$
Toxine-Quinine à 5 p. 1.000.	$pH = 7,3$
3) Toxine-acide β -oxynaphtoïque à 5 p. 1.000	$pH = 6,4$
Toxine-acide β -oxynaphtoïque à 2,5 p. 1.000.	$pH = 6,7$
4) Toxine + acide benzoïque à 4 p. 1.000	$pH = 5$
5) Toxine + acide salicylique à 4 p. 1.000.	$pH = 5,3$

Nous avons vu précédemment que l'anatoxine antistaphylococcique fixe l'anatoxine correspondante.

Les autres complexes atoxiques ont-ils une affinité vis-à-vis de l'antisérum?

EXPÉRIENCE XXIX. — Dans une série de tubes, on place une dose fixe (0 c. c. 2) de sérum antistaphylococcique, puis une dose fixe (0 c. c. 5) du complexe à étudier. On laisse en contact pendant vingt minutes, après quoi on ajoute des quantités décroissantes de toxine. On laisse les mélanges en contact, puis, on ajoute une goutte de globules rouges et on recherche la présence ou l'absence d'hémolyse.

		DILUTIONS DE TOXINE				
		0,25	0,1	0,05	0,025	0,01
Toxine pure		++++	++++	++++	++++	++++
Toxine + sérum		++++	—	—	—	—
Toxine {	Anatoxine S19.	++++	++++	++++	++++	++++
	Anatoxine S16.	++	++	++	+	+
+ {	Toxine naphtoiq.	++++	—	—	—	—
Sérum {	Toxine salicylique.	++++	—	—	—	—
+ {	Toxine benzoïque.	++++	+++	—	—	—
	Toxine quinine	++	—	—	—	—

On voit nettement que l'anatoxine se différencie des autres complexes atoxiques par son affinité particulière pour le sérum anti.

*
* *
*

Dans un prochain mémoire, nous examinerons la question de l'immunité antistaphylotoxique.

Résumé et Conclusions.

1° Le milieu utilisé par G. Ramon pour la production de la toxine diphtérique se montre supérieur à ceux étudiés jusqu'ici pour la production de la toxine staphylococcique.

2° L'addition d'une petite quantité de glucose au milieu favorise la production de la toxine.

3° L'augmentation de virulence d'une souche de staphylocoques par passages successifs chez l'animal ne modifie en rien le pouvoir toxique de la souche.

4° Au contraire, les passages successifs *in vitro* permettent de rendre la production de toxine plus régulière mais n'augmentent pas le taux de toxicité.

5° Le pouvoir hémolytique de la toxine est inhibé par le bouillon « N »; les globules sont cependant touchés par la toxine.

6° Le sérum anti ne « guérit » pas les globules rouges préalablement touchés par la toxine.

7° Les globules rouges, mis préalablement en contact avec

l'anatoxine staphylococcique, se comportent, vis-à-vis de la toxine staphylococcique, comme des globules rouges neufs.

8° La toxine staphylococcique provoque, *in vivo*, des lésions importantes de nombreux organes, se manifestant par une destruction des protoplasmes cellulaires, destruction d'autant plus marquée que la cellule est plus délicate.

9° L'injection intraveineuse d'une dose appropriée de toxine staphylococcique détermine la mort du lapin ou du chien par déficience cardiaque.

Lorsque la dose injectée permet à l'animal une survie de quelques jours, la mort peut avoir en outre, comme cause secondaire, des troubles fonctionnels du foie, du rein et des poumons.

10° La toxine staphylococcique est sans action sur le trypanosome.

11° Les pouvoirs hémolytique et dermatotoxique relèvent d'une seule et même substance; nos conclusions quant à l'unicité de la toxine staphylococcique sont en concordance avec celles de Burnet et Gengou et en opposition avec celles de J. Parker, et Gunther, et Burky.

12° Le lapin n'est ni sensibilisé, ni désensibilisé par une dose préparante de toxine.

13° La toxine staphylococcique est rendue atoxique dans des délais divers par différents corps, notamment par les acides forts, par les corps dits cryptotoxiques (acides benzoïque, salicylique, β -oxynaphtoïque, etc....), par l'oléate de soude, par le bichlorhydrate de quinine et par le formol (anatoxine).

14° L'anatoxine staphylococcique se fixe sur le sérum anti avec une affinité particulière et propre à ce corps; en effet, les autres complexes atoxiques sont dépourvus de cette propriété.

BIBLIOGRAPHIE

- BURKY (E. L.). *J. Allergy*, **3**, 1932, p. 438; *Journ. of imm.*, **24**, 1933, p. 93.
 BURNET (F. M.). *Journ. of Path. a. bact.*, **32**, 1929, p. 717; *id.*, **33**, 1930, p. 1; *id.*, **34**, 1931, p. 759; *id.*, p. 741.
 BURNET (F. M.) et FREEMAN (M.). *Journ. Path., a. Bact.*, **35**, 1932, p. 477.
 BURNET (F. M.) et KELLAWAY (C. H.). *Med. Journ. of austr.*, n° 2, 1930, p. 295.
 DENYS (J.) et VANDEVELDE (H.). *La Cellule*, **11**, 1895, p. 357.
 DOLMAN (C. E.). *Canad. Publ. health Journ.*, n° 23, 1932, p. 125; *Studies from the Connaught Lab.* (Univ. Toronto), vol. 5, 1931-32, p. 309.

- DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et KOSSOVITCH. *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 241.
- DUMAS (M. J.). *Ces Annales*, **28**, 1914, p. 213.
- FORSMAN (J.). *Act. path. et mic. Scandinav.*, 1932, p. 202.
- GENGOU (O.). *Arch. intern. Méd. exp.*, **24**, 1930, p. 633; *id.*, vol. 6, 1931, p. 211; *Ces Annales*, **48**, 1932, p. 19; *id.*, p. 135.
- GROSS (H.). *Zeitstr. f. Hyg. u. Infekt.*, **109**, 1929, p. 479; *Centralb. f. Bakt.*, **123**, p. 212.
- JORDAEN (E. O.), DACK (J. M.) et WOOLPERT (A.). *Journ. of prev. Med.*, **5**, 1931, p. 383.
- KALLAWAY (C. H.), BURNET (F. M.) et WILLIAMS (F. E.). *Journ. of Path. a. Bact.*, **35**, 1930, p. 889.
- NÉLIS (P.). *Ces Annales*, **40**, 1926, p. 66; *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, 1933, p. 7; *id.*, **114**, p. 598.
- NÉLIS (P.) et BOUCKAERT (J. J.). *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, p. 1157.
- NÉLIS (P.) et PICARD (E.). *C. R. Soc. de Biol.*, **113**, p. 1321.
- NEISSER (M.) et WECHSBERG (F.). *Zeit. f. Hyg. u. Infekt.*, **36**, 1901, p. 299.
- NICOLLE (M.) et CESARI (E.). *Ces Annales*, **28**, 1914, p. 219.
- PANTON (P. N.) et VALENTINE (F.). *The Lancet*, 1930, p. 506.
- PARISH (H. J.) et CLARKE (W. M. H.). *Journ. of Pathol. a. Bact.*, **35**, 1932, p. 251.
- PARKER (J.). *Journ. of Exp. Med.*, **11**, 1924, p. 761.
- PARKER (J.) et GUNTHER (A.). *Journ. of Exp. Med.*, **54**, 1931, p. 315.
- RAMON (G.). *C. R. Soc. de Biol.*, **112**, 1933, p. 8.
- REMÉ (G.). *Mon. f. Kinderh.*, n° 48, 1930, p. 70.
- REMÉ (G.). *Zeit. f. Imm. u. Exp. Ther.*, n° 69, 1930, p. 23.
- TRAVAS-OS. *C. R. Soc. de Biol.*, **114**, 1933, p. 369.
- WALBUM (L. E.). *Biochem. Zeit.*, **129**, 1922, p. 369; *Act. path. Scandinav.*, Suppl., **3**, 1930, p. 477.

ÉTUDES SUR LA BACILLÉMIE TUBERCULEUSE RECHERCHES EXPÉRIMENTALES ET CLINIQUES

par A. SAENZ.

(*Institut Pasteur. Laboratoires des recherches sur la tuberculose.*)

Depuis la découverte du bacille de Koch, la recherche de la bacillémie au cours de l'infection tuberculeuse n'a pas cessé d'intéresser les cliniciens et les bactériologistes.

A l'heure actuelle, on peut dire que, dans l'ordre expérimental, l'existence de cette bacillémie chez les animaux artificiellement infectés est un fait acquis. Les travaux de ces dernières années ont réussi à démontrer, par des méthodes simples, que le passage des bacilles dans le sang des animaux tuberculeux est si fréquent et si constant qu'il est maintenant universellement admis par les expérimentateurs.

En effet, parmi tant d'autres, les recherches déjà anciennes de Massol et Breton de l'école de Calmette, puis celles de S. Griffith, Léon Bernard, Robert Debré et Baron, Allen Krause, Willis, et en dernier lieu celles de Boquet, Valtis et de nous-même démontrent, non seulement la constance de la bacillémie dans la tuberculose expérimentale, mais aussi les relations étroites qui existent entre la rapidité de son apparition, la quantité de germes infectants, leur virulence et les voies d'introduction ou d'inoculation employées.

En étudiant le mécanisme de l'infection par le bacille tuberculeux des mammifères inoculé au cobaye par voie péritonéale, A. Boquet, en collaboration avec nous-même, avait démontré la rapidité et la constance avec lesquelles ces bacilles passent et se retrouvent dans la circulation sanguine. Des cobayes

ayant reçu par la voie péritonéale 0 milligr. 001 de bacilles virulents (souche bovine Vallée) en suspension dans 1 cent. cube d'eau physiologique accusent une bacillémie décelable par inoculation au cobaye, qui se manifeste déjà deux à quatre heures après l'inoculation, pour diminuer sans disparaître pendant la période d'invasion et se reproduire dans la période terminale de la maladie. Nous avons obtenu les mêmes résultats avec Costil en employant la méthode d'hémoculture de Læwenstein pour déceler la bacillémie.

Cobaye inoculé par la voie péritonéale avec la souche humaine Ratti
(1 milligramme) et saigné par ponction du cœur.

INTERVALLE entre l'inoculation et les prélèvements	NOMBRE de colonies par cent. cube de sang
—	—
1 jour.	9
3 jours	2
6 jours	0
8 jours	0
10 jours	2
21 jours	6

Ce cobaye est mort deux jours après la dernière saignée de tuberculose généralisée.

Cobaye inoculé par la voie péritonéale avec la souche bovine Vallée
(1 milligramme) et saigné par ponction du cœur.

INTERVALLE entre l'inoculation et les prélèvements	NOMBRE de colonies par cent. cube de sang
—	—
1 jour.	9
3 jours	2
5 jours	0
7 jours	0
15 jours	0
21 jours	3

Ce cobaye, mort vingt-sept jours après l'inoculation, présentait des lésions de tuberculose généralisée.

Chez les cobayes inoculés par voie intraganglionnaire avec des bacilles des mammifères, type humain, la bacillémie est décelable par hémoculture avec les mêmes caractères, comme le montre le tableau ci-dessous :

**Cobaye ayant reçu 2 milligrammes d'une souche humaine
dans le ganglion cervical droit.**

INTERVALLE entre l'inoculation et les prélèvements	NOMBRE de colonies par cent. cube de sang
—	—
2 jours	3
3 jours	1
5 jours	1
7 jours	1
9 jours	1
21 jours (période agonique)	8

L'autopsie de ce cobaye, mort aussitôt après la saignée, permet de constater l'hypertrophie et la caséification du ganglion cervical droit, des lésions de broncho-pneumonie tuberculeuse, des nodules parsemant le foie et la rate et la caséification des ganglions inguinaux et sous-hépatiques.

Avec la dose de 1 milligramme inoculé par la même voie, l'hémoculture pratiquée comme précédemment a donné des résultats superposables.

**Cobaye ayant reçu 1 milligramme d'une souche humaine
dans le ganglion cervical droit.**

INTERVALLE entre l'inoculation et les prélèvements	NOMBRE de colonies par cent. cube de sang
—	—
1 jour	13
3 jours	12
6 jours	4
10 jours	0
20 jours	0
34 jours	0
50 jours	1
60 jours	1

Ce cobaye est mort de tuberculose généralisée soixante-cinq jours après l'inoculation.

Chez le lapin, nous avons recherché la bacillémie en utilisant la voie intraveineuse. Nous avons inoculé à deux de ces animaux 1 milligramme de bacilles tuberculeux, du type aviaire, cultivés depuis vingt jours sur pomme de terre glycinée et émulsionnés en eau physiologique. Les prélèvements ont été effectués à des intervalles variables, d'après la technique suivante. A l'aide d'une seringue contenant 1/2 cent. cube d'eau distillée stérile, on prélève aseptiquement 1/2 cent. cube de sang par ponction de la veine marginale de l'oreille. On agite

fortement et on ensemence le sang hémolysé à la surface de 4 tubes de milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite, à raison de 1/4 de centimètre cube. Voici les résultats obtenus.

Lapin A.	
INTERVALLES entre l'inoculation et les prélèvements	NOMBRE de colonies par cent. cube de sang
30 minutes.	656
1 heure.	1.026
2 heures	837
4 heures	167
24 heures	30
5 jours	6
15 jours	560

Ce lapin, mort le lendemain de la dernière saignée, a été trouvé porteur de lésions de tuberculose généralisée aiguë, type Yersin, caractérisée par l'hypertrophie de la rate et du foie et des lésions granuleuses sur les poumons. Les frottis de tous ces organes contenaient de nombreux bacilles acido-résistants.

Le lapin B mort dans le même délai a donné des résultats superposables à ceux du lapin précédent.

En inoculant dans les mêmes conditions 1/100 ou 1/1.000 de milligramme de bacilles tuberculeux, type aviaire, au lapin, les résultats sont moins nets comme le montre l'exemple suivant :

Lapin inoculé avec 1.1.000 de milligramme d'une souche aviaire par voie intraveineuse.

INTERVALLE entre l'inoculation et les prélèvements	NOMBRE de colonies par cent. cube de sang
6 heures.	20
24 heures.	3
3 jours.	1
6 jours.	3
10 jours.	0
15 jours.	0
21 jours.	0
27 jours.	0
35 jours.	2

Ce lapin est mort de maladie intercurrente trois jours après la dernière saignée.

Comme suite à ces recherches, nous avons étudié le méca-

nisme de la bacillémie produite par le bacille aviaire chez la souris qui est sensible à ce microorganisme. En raison de la forme septicémique habituelle que l'infection aviaire provoque chez la souris et de la facilité avec laquelle ce germe se développe sur les milieux de culture appropriés, nous avons simplement procédé par ensemencement du sang.

Voici la technique que nous avons adoptée avec Costil :

Dans une première série d'expériences, 10 souris sensiblement de même poids ont reçu par voie péritonéale, sous le volume de 0 c. 5, 0 milligr. 1 d'une souche de bacilles aviaires récemment isolée, cultivée sur pomme de terre glycinée et âgée de quinze jours. Leur sang a été ensuite prélevé à des intervalles variés, de la manière suivante. Après avoir désinfecté la queue à l'alcool, on la sectionne avec des ciseaux stériles à 1 ou 2 millimètres de son extrémité. On plonge alors dans la goutte de sang qui sourd l'extrémité d'une fine pipette contenant déjà V ou VI gouttes d'eau distillée stérile; on aspire légèrement pour bien diluer le sang et on ensemence le tout sur un tube de milieu de Læwenstein. On répète l'opération pour ensemencer de la même manière un deuxième tube.

INTERVALLE entre l'inoculation et les prélèvements	NOMBRE de colonies par cent. cube de sang
—	—
30 minutes	37
2 heures	15
4 heures	19
7 heures	2
24 heures	1
2 jours	8
5 jours	1
12 jours	15
22 jours	20

Une deuxième série d'expériences a porté sur 10 autres souris qui ont reçu, suivant la même technique, 1/100 de milligramme de la même souche.

INTERVALLE entre les inoculations et les prélèvements	NOMBRE de colonies par cent. cube de sang
—	—
30 minutes	5
2 heures	2
4 heures	2
7 heures	1
24 heures	1
2 jours	1
5 jours	0
12 jours	0
22 jours	0

Un troisième lot de 10 souris ont été inoculées avec 1/1.000 de milligramme dans les mêmes conditions que précédemment.

INTERVALLE entre l'inoculation et les prélèvements	NOMBRE de colonies par cent. cube de sang
—	—
30 minutes.	2
2 h. 1/2	1
6 heures	0
24 heures	0

Les souris du premier lot inoculées avec 0 milligr. 1 sont mortes dans un délai variant de vingt à vingt-cinq jours. La rate et le foie hypertrophiés fourmillaient de bacilles et présentaient le type classique de tuberculose décrit par Yersin en 1888 chez le lapin. Par contre, les souris qui avaient reçu 1/100 et 1/1.000 de milligramme de culture ont vécu beaucoup plus longtemps et présentaient des lésions d'un caractère particulier que nous décrivons plus tard.

Une autre expérience, effectuée dans les mêmes conditions avec une souche aviaire IV, entretenue depuis longtemps au laboratoire, a fourni des résultats identiques.

Nos constatations établissent d'abord que le bacille passe très rapidement dans la circulation sanguine et ensuite qu'avec la dose de 0 milligr. 1, on provoque une bacillémie permanente. Cette bacillémie, très abondante dès les premières heures après l'inoculation, diminue les jours suivants, puis augmente dans la phase terminale. Par contre, avec les doses de 1/100 et 1/1.000 de milligramme la bacillémie, également précoce dans ses débuts, s'arrête quelques heures après.

L'ensemble de ces recherches peut être ainsi résumé :

Déjà quelques minutes après l'inoculation, on observe une bacillémie qui dure plusieurs jours, pour diminuer ou disparaître ensuite et réapparaître dans la période finale, chez les animaux qui meurent de tuberculose évolutive.

Ces faits montrent que l'intensité et l'ampleur de la bacillémie expérimentale pour les animaux réceptifs (cobayes, lapins, souris), qu'il s'agisse du bacille des mammifères ou du bacille aviaire, dépendent de la dose et de la voie d'inoculation et que le mécanisme pathogénique est identique dans ces divers cas. Mais si ces faits d'ordre purement expérimental restent définitivement acquis, un coup d'œil jeté sur l'énorme littérature consacrée à la mise en évidence du bacille de Koch

dans le sang circulant des malades tuberculeux suffit pour constater les fluctuations que cette recherche a subies au cours des différentes époques.

En 1915, les recherches de Léon Bernard, Debré et Baron, vite confirmées en France par celles de Nobécourt et Darré, par Rist, Armand-Delille et Lévy Bruhl, et en Amérique par Verbizier, Rosenberg, Ravenel et Smith, puis par Anderson, en Allemagne par Bacmeister et Rueben, par Querner, Dreesen et enfin par Elsaesser avaient semblé mettre de l'ordre dans ce chaos en montrant la rareté de la bacillémie au cours de la tuberculose.

Mais, malgré d'innombrables travaux, les divergences d'opinion sont encore considérables, surtout en ce qui concerne la fréquence de la bacillémie dans la clinique humaine où, par suite de l'insuffisante précision des méthodes techniques généralement employées, les résultats obtenus par les différents expérimentateurs ont été souvent contradictoires. C'est pour cela que la presque unanimité des cliniciens estime que la question est loin d'être résolue.

Ce problème était posé dans ces termes quand Lœwenstein, en 1930, fit connaître sa méthode d'hémoculture au moyen de laquelle il devenait très facile de déceler le bacille de Koch dans le sang. En se basant sur plus de 5.000 hémocultures pratiquées suivant cette méthode, Lœwenstein affirma que la bacillémie est très fréquente, souvent même abondante, non seulement chez les phthisiques avérés, mais aussi chez les malades atteints de tuberculoses cutanées, osseuses, articulaires, rénales, oculaires, et même au cours d'autres maladies telles que le rhumatisme articulaire aigu ou chronique, et dans certaines affections du système nerveux. Voici un résumé des résultats obtenus jusqu'à présent par Lœwenstein et ses collaborateurs par l'hémoculture à Vienne :

Les résultats de Lœwenstein et de ses collaborateurs concernant les diverses formes de tuberculose peuvent se résumer ainsi : 100 p. 100 d'hémocultures positives dans les formes aiguës et miliaires de tuberculoses pulmonaires, intestinales ou méningées, dans la tuberculose fibro-caséuse chronique 70 p. 100 et 16 p. 100 dans les tuberculoses latentes du poumon. 70 p. 100 de résultats positifs dans la tuberculose rénale ;

53 p. 100 dans les tuberculoses laryngées et 53 p. 100 dans les diverses formes de tuberculoses osseuses ou cutanées.

AUTEURS	NATURE DE LA MALADIE	NOMBRE de cas examinés	RÉSULTATS positifs
Lœwenstein	Tuberculoses pulmonaires.	140	54
Lœwenstein	Tuberculoses cutanées.	347	117
Lœwenstein	Tuberculoses laryngées.	47	26
Lœwenstein	Tuberculoses rénales.	22	13
Lœwenstein	Tuberculoses osseuses.	18	9
Lœwenstein	Tuberculoses oculaires.	4	3
Lœwenstein	Rhumatisme articulaire aigu.	27	22
Lœwenstein	Erythème noueux.	14	12
Lœwenstein	Chorée.	9	5
Lœwenstein	Névrite rétro-bulbaire.	6	4
Lœwenstein	Sclérose en plaques.	40	17
Lœwenstein	Schizophrénie.	24	9
Fischer	Tuberculoses pulmonaires.	62	26
Fischer	Tuberculoses osseuses.	15	5
Fischer et Urgoiti	Tuberculoses diverses.	615	253
Jérusalem et Urgoiti . . .	Tuberculoses extra-pulmonaires.	60	10
Urgoiti	Tuberculoses ostéo-articulaires.	67	26
Wessely et Lœwenstein . .	Tuberculoses laryngées.	47	26
Kren et Lœwenstein . . .	Tuberculoses cutanées.	51	38
Lœwenstein et Ruseff . . .	Tuberculoses miliaires.	23	23
Lœwenstein et Ruseff . . .	Méningites tuberculeuses.		
Lœwenstein et Ruseff . . .	Tuberculoses chirurgicales.	8	6
Lœwenstein et Ruseff . . .	Tuberculoses du poumon.	17	6
Kissmeyer et Lœwenstein .	Lésions cutanées non diagnostiquées.	98	10
Reitter et Lœwenstein . . .	Rhumatisme articulaire aigu.	82	56
Konrad	Tuberculoses cutanées.	52	22
Kissmeyer et Lœwenstein .	Lupus vulgaris.	353	23,8 p. 100.
Kissmeyer et Lœwenstein .	Lupus érythémateux.		6 —
Kissmeyer et Lœwenstein .	Adénites tuberculeuses.		21 —
Kissmeyer et Lœwenstein .	Sarcosides de Boeck		18 —
Kissmeyer et Lœwenstein .	Tuberculoses colliquatives.		50 —
Kissmeyer et Lœwenstein .	Tuberculides.		40 —

En ce qui concerne les types de bacilles isolés par l'auteur de la méthode et ses collaborateurs, il faut remarquer que, dans la plupart des cas étudiés, cette identification s'est limitée au simple examen microscopique, fait après des délais variables, des produits de raclage des tubesensemencés; quelquefois aussi par la détermination des caractères des bacilles des mammifères, dans les cas où l'on obtenait le développement de colonies macroscopiques visibles. Seulement dans un nombre réduit de cas, l'étude des bacilles isolés a démontré qu'il s'agissait de bacilles de *type humain*, ou très rarement *bovin*. Ce

dernier a été trouvé surtout par Læwenstein dans des tuberculoses osseuses. Le *type aviaire* a été signalé également par Læwenstein et ses collaborateurs dans une importante proportion de cultures isolées de lésions tuberculeuses de la peau.

Disons tout de suite que ces résultats, publiés par Læwenstein et ses collaborateurs depuis trois ans, n'ont pu être, jusqu'à présent, que très partiellement confirmés dans les nombreux laboratoires qui ont appliqué la méthode d'hémoculture dont il s'agit.

Les modifications successives que l'auteur a introduites peuvent être rendues responsables de beaucoup d'échecs. En deux années la formule du milieu a été changée quatre fois, et il en a été de même des diverses phases de traitement du culot de centrifugation à ensemer (A), (B), (C), (D), sans que Læwenstein ait basé ces changements continuels sur des raisons théoriques ou expérimentales valables. Il en est résulté des critiques et des discussions très vives dans les Sociétés savantes, en Autriche et en Allemagne comme ailleurs, de sorte que certains expérimentateurs se sont demandé si ce que l'on obtenait dans les cas d'hémocultures positives était bien réellement des cultures de bacilles tuberculeux des mammifères.

En dehors du laboratoire de Læwenstein, nous avons été l'un des premiers à contrôler sa méthode après avoir pris la peine d'aller l'étudier sur place, à Vienne, où il nous est agréable de dire que nous avons reçu le plus aimable accueil.

Depuis décembre 1930, nous avons pu étudier plus de 700 échantillons de sang (ce qui représente plus de 4.200 tubesensemencés) provenant de malades suspects de tuberculose, de rhumatisme ou de maladies nerveuses des services du professeur L. Sayé, à Barcelone, des professeurs ou D^{rs} Debré, Sergeant, Léon Bernard, Lemierre, Weill-Hallé, Bezançon, Hocquart, Chevallier, Abrami, Armand-Delille, Claude, Laignel-Lavastine, Laederich, Coste et Mozer, etc.

Avant d'analyser nos résultats, qu'il nous soit permis de rappeler les bases expérimentales de la méthode. Elle repose essentiellement sur deux conditions également importantes.

1° L'emploi d'un milieu de culture spécial, à l'œuf-asparagine;

2° Le traitement préalable du sang à ensementer.

Études sur le séparation.

Parmi les diverses formules préconisées par son auteur, nous nous sommes arrêté à celle qui, par des essais comparatifs, nous a montré une supériorité évidente quant à sa sensibilité. Voici sa composition :

On commence par préparer un liquide nutritif avec :

Phosphate monopotassique, en grammes	1
Asparagine, en grammes	3
Citrate de soude, en grammes.	1
Glycérine à 30° neutre, en grammes.	60
Sulfate de magnésium, en grammes.	1
Eau distillée, en centimètres cubes.	1.000

Cette solution, portée deux heures à 100°, se conserve sans s'altérer.

A 150 cent. cubes de cette solution, on ajoute, dans un ballon stérile contenant des perles de verre :

Farine de pomme de terre (Merck), en grammes	
Glycérine neutre à 30° stérilisée, en grammes	12

On agite et on chauffe à 100° pendant quinze minutes, puis une heure à 56°.

A ce mélange, maintenu à 56°, on ajoute en agitant continuellement avec des perles de verre placées d'avance dans le vase stérile :

4 œufs complets + 1 jaune d'œuf.

5 cent. cubes d'une solution aqueuse stérile de vert-malachite (Merck) à 2 p. 100.

On peut substituer au vert-malachite 10 cent. cubes d'une solution aqueuse stérile à 2 p. 100 de *rouge congo*. Mais nous avons renoncé depuis longtemps à cette substitution parce que le rouge congo est dépourvu de tout effet antiseptique.

On filtre sur gaze stérile et on répartit en tubes stériles à raison de 5 à 6 cent. cubes par tube. On tyndallise deux jours de suite à 80-85° en vapeur humide, pendant deux heures chaque jour.

On laisse les tubes pendant vingt-quatre heures à l'étuve à 38° pour contrôler leur stérilité.

Depuis trois ans, nous avons fait des expériences variées et très nombreuses pour préciser la sensibilité de ce milieu de culture. Elles nous permettent d'affirmer qu'il doit sa supériorité sur les autres formules à sa teneur en asparagine.

Nous avons d'abord limité nos observations à deux souches, l'une bovine, depuis longtemps entretenue en divers laboratoires sous la dénomination de souche Vallée, l'autre humaine, la souche Ratti. Ces souches étaient cultivées sur pomme de terre-bouillon glyceriné à 4 p. 100. Lorsqu'elles étaient âgées de quinze à vingt jours, on en prélevait une parcelle qui, après essorage entre deux feuilles de papier-filtre stérile, était soigneusement pesée et émulsionnée dans du liquide de Sauton dilué au quart, de telle sorte que cette émulsion mère contint 1 milligramme de bacilles par centimètre cube. On préparait ensuite par dilutions des émulsions de concentrations décroissantes jusqu'à 1/100.000.000 de milligramme par centimètre cube. Bien entendu, pour préparer chacune de ces dilutions, on n'utilisait jamais la même pipette, mais pour chaque dilution une pipette neuve stérile et, avec chaque pipette, on ensemait 4 tubes en étalant sur toute la surface de chaque tube 0 c. c. 5 de la dilution correspondante. Les tubes ainsi ensemencés étaient ensuite maintenus horizontalement à l'étuve à 38° et on comptait les colonies après des temps variables en notant le début de leur apparition.

Une première série d'expériences effectuées avec Costil en procédant ainsi a démontré que le milieu de Læwenstein est de beaucoup le plus favorable à l'isolement des bacilles tuberculeux, très supérieur dans tous les cas aux milieux de Pétroff, Dorset, Lubenau et Hohn et plus sensible que le milieu de Petragnani si l'on n'a pas soin de remplacer, comme nous l'indique le tableau ci-dessous, la peptone par l'asparagine (1) :

(1) Voici comment on procède : on fait dissoudre 1 gr. 25 d'asparagine dans un vase d'Erlenmayer de 1 litre, dans lequel on a préalablement versé 200 grammes de lait frais de vache et 8 grammes de fécule de pomme de terre (marque Vosgues). On chauffe au bain-marie jusqu'à ébullition pendant une heure et, pour le reste, on suit exactement la technique indiquée par Petragnani (*Sul terreno al verde di malaquita e sulla tecnica per l'isolamento dei bacilli tubercolari. Policlinico, Sez. pratica, 1928*).

TABLEAU I. — Souche humaine Ratti.

QUANTITÉ de bacilles ensemencés en milligrammes	NOMBRE DE COLONIES après dix-sept jours	
	Petragnani original (2 tubes par cent. cube)	Petragnani modifié (2 tubes par cent. cube)
0,000.1	33	44
0,000.01	18	21
0,000.001	4	17
0,000.0001	0	0

TABLEAU II. — Souche bovine Vallée.

QUANTITÉ de bacilles ensemencés en milligrammes	NOMBRE DE COLONIES après vingt-sept jours		
	Petragnani original	Petragnani modifié	Lœwenstein
0,000.1	54	72	67
0,000.01	7	9	10
0,000.001	2	2	2
0,000.000.1	0	0	0

De l'ensemble de ces constatations, il ressort qu'on peut, sur les deux milieux, Petragnani modifié et Lœwenstein, obtenir des cultures jusqu'à des dilutions à 1 millionième (0,000.001 milligr.), et que, généralement, avec la souche humaine que nous avons utilisée, le nombre des colonies s'est montré plus élevé qu'avec notre souche bovine. Dans tous les cas, l'avantage de la substitution de l'asparagine à la peptone dans le milieu de Petragnani est manifeste.

D'ailleurs, dans des expériences comparatives effectuées avec ce milieu et par l'inoculation au cobaye, nous avons démontré avec Costil que, dans les liquides paucibacillaires ne contenant que 20 bacilles par centimètre cube, la culture de Lœwenstein et l'inoculation fournissent des résultats concordants. Enfin, avec Eisendrath, nous avons employé le milieu de Lœwenstein pour l'étude bactériologique de 77 échantillons d'urines provenant de malades suspects de tuberculose rénale, et, d'autre part avec Costil, 74 liquides céphalo-rachidiens provenant de ménin-

gites tuberculeuses et 80 produits d'expectoration suspects.

Les résultats ont été les suivants :

Sur les 77 échantillons d'urines, dont 20 négatifs à l'examen direct et après homogénéisation, 50 ont donné un résultat positif en fournissant tous ultérieurement une culture de bacilles des mammifères. Sur les 74 liquides céphalo-rachidiens provenant de méningites tuberculeuses, tous ont donné lieu au développement d'une culture de bacilles virulents, bien que 26 de ces liquides n'aient montré aucun bacille à l'examen direct.

Sur les 80 échantillons de produits d'expectoration suspects, nous n'en retiendrons ici que 24 qui ne présentaient de bacilles ni à l'examen direct ni après homogénéisation, mais qui ont donné ultérieurement une culture de bacilles.

Dans notre procédé d'isolement du bacille de Koch, nous employons systématiquement le milieu de Lœwenstein ou celui de Petraghani dans lequel nous avons remplacé la peptone par l'asparagine; leur utilisation par nos collaborateurs et par d'autres chercheurs, depuis que nous les avons introduits dans le laboratoire de M. Calmette à l'Institut Pasteur, a constamment donné d'excellents résultats dans l'ensemencement de plusieurs centaines de produits tuberculeux de provenances diverses.

Nous estimons que jusqu'à ce qu'un autre milieu plus sensible nous soit offert, c'est aux milieux de Lœwenstein et de Petraghani à l'asparagine qu'il faut donner la préférence toutes les fois qu'il s'agit de pratiquer en partant du sang ou de produits pathologiques quelconques l'isolement du bacille tuberculeux.

Pour l'ensemencement du sang, parmi les diverses techniques préconisées par Lœwenstein, nous avons adopté jusqu'en janvier 1933 celle-ci :

Nous recevons dans un tube à essai de 22 millimètres, contenant 3 cent. cubes d'une solution de citrate de soude à 10 p. 100, 5 ou 10 cent. cubes de sang prélevé par ponction veineuse aseptique et ainsi rendu incoagulable : on ajoute, après décantation du plasma, 10 à 20 cent. cubes d'une solution stérile d'acide acétique à 3 p. 100. On laisse en contact pendant cinq minutes et on prélève ensuite, à l'aide d'une boule de Miquel,

le sang hémolysé. Celui-ci est versé dans un grand tube centrifugeur de 300 cent. cubes de capacité, qu'on a préalablement garni de 20 cent. cubes d'eau distillée stérile. On remplit ensuite le tube avec de l'eau distillée. On centrifuge pendant un quart d'heure à 3.000 tours. On rejette le liquide surnageant et on lave le culot globulaire, en l'agitant violemment à l'aide d'une baguette stérile, dans 200 à 250 cent. cubes d'eau distillée. Ce lavage suivi de centrifugation suffit pour éliminer complètement l'hémoglobine qui, d'après Læwenstein, empêcherait le développement du bacille de Koch. Si le culot est bien préparé il prend alors une couleur blanc grisâtre.

On l'aspire dans une pipette d'assez gros calibre et on l'ensemence sur 6 à 8 tubes du milieu à l'œuf-asparagine-vert malachite ci-dessus décrit.

Le culot d'ensemencement du sang, pour les hémocultures que nous avons effectuées pendant l'année 1933, en tenant compte des nouvelles indications de Læwenstein formulées dans le programme de la Section d'Hygiène de la Société des Nations, a été préparé comme suit :

20 cent. cubes de sang ont été recueillis par ponction veineuse aseptique dans l'appareil « Haemaut » de 30 cent. cubes de capacité, contenant 2 cent. cubes d'une solution de citrate de soude à 10 p. 100. Après avoir pris les précautions nécessaires pour l'ouverture du col de cet appareil, on décante avec une pipette à boule le plasma surnageant, la sédimentation ayant été réalisée par un séjour de vingt-quatre heures en position verticale au laboratoire. Le sédiment d'hématies, fortement agité, est transvasé, au moyen d'une autre pipette à boule, dans un tube centrifugeur de 200 cent. cubes contenant 10 cent. cubes d'eau distillée. On rince l'Haemaut avec de l'eau distillée stérile et avec ce produit de rinçage on achève de remplir le tube centrifugeur. On centrifuge pendant vingt minutes à 2.000 tours. On rejette le liquide surnageant et on lave de nouveau le culot, en l'agitant violemment à l'aide d'une baguette de verre stérile, dans 200 cent. cubes d'eau distillée stérile. On centrifuge de nouveau et le culot ainsi obtenu est traité par 2 cent. cubes d'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant trois minutes. On complète alors avec de l'eau distillée stérile le contenu du tube, on agite de nouveau le culot et on centrifuge

une troisième fois pendant quinze minutes. La même opération de lavage et de centrifugation est répétée une quatrième fois. Alors l'hémoglobine se trouve complètement éliminée et le culot, qui a pris une coloration blanc grisâtre, est ensemencé comme précédemment sur 6 tubes de milieu de Læwenstein au vert malachite.

Disons tout de suite qu'en employant soit la technique primitive de Læwenstein légèrement modifiée par nous, soit la seconde indiquée dans le programme de la Société des Nations, nous avons obtenu un pourcentage de cultures macroscopiques d'emblée sensiblement identique.

Mais il devenait nécessaire, puisque l'auteur de la méthode n'avait pas donné les raisons d'un tel changement, de vérifier expérimentalement si la substitution de l'acide acétique par l'acide sulfurique comme agent d'hémolyse du sang était fondée. Ce sont les expériences que nous relatons ci-dessous, effectuées avec L. Costil et M. Sadettin, qui répondent à cette question.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Le 2 mai 1933, nous avons préparé avec une souche d'origine humaine (Ratti) cultivée sur pomme de terre glycinée et âgée de quatorze jours, une émulsion contenant 10 centigrammes par centimètre cube de bacilles pesés à l'état humide et non essorés dans du liquide de Sauton dilué au 1/4. 1/2 cent. cube de cette émulsion était ensuite mélangé à 4 c. c. 5 de solutions d'acide sulfurique à 10, 20, 30 et 40 p. 100. On obtenait ainsi des suspensions microbiennes contenant 1 centigramme de bacilles par centimètre cube qu'on laissait en contact avec l'acide sulfurique pendant des temps variables. On se débarrassait de l'acide au moyen de trois lavages et centrifugations successifs avec du liquide de Sauton stérile. Le contrôle de la neutralité était assuré après le dernier lavage au moyen de quelques gouttes de teinture de tournesol. On dilue en sérum physiologique les bacilles ainsi traités à une concentration correspondant à 1/10 de milligramme par centimètre cube. 2 cent. cubes de ce mélange furent ensuite ensemencés à partie égale à la surface de 4 tubes de milieu à l'œuf, 2 de Læwenstein et 2 de Petraghani à l'asparagine. 4 autres tubes ensemencés avec une émulsion contenant 1/10 de milligramme de bacilles non traités par centimètre cube ont servi de témoins.

Nous avons fait ainsi trois séries d'expériences suivant que la durée de contact a été de trente, quarante-cinq ou soixante minutes.

Dans la première série, nous avons constaté que le nombre de colonies était identique dans les tubes ensemencés avec les bacilles traités par l'acide sulfurique à 10, 20, 30 et 40 p. 100

pendant une demi-heure et dans les tubes témoins. En effet, trente jours après, le développement est également abondant dans tous les tubes.

Les mêmes résultats ont été obtenus pour les concentrations d'acide sulfurique à 10 et 20 p. 100 demeurées en contact avec les bacilles pendant quarante-cinq et soixante minutes. Seuls les tubesensemencés avec les bacilles traités par l'acide sulfurique à 30 et 40 p. 100 sont demeurés stériles.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Les expériences précédentes ne nous ont pas permis de mettre en évidence l'action nocive de l'acide sulfurique sur le bacille de Koch, étant donnée la dose massive de bacillesensemencés. Nous avons donc recommencé une nouvelle série de cultures en employant des émulsions plus diluées, contenant de 1/1.000 à 1/100.000 de milligramme de bacilles par centimètre cube que nous avons laissés en contact avec l'acide sulfurique à 10, 15 et 20 p. 100 pendant une demi-heure. Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau ci-dessous :

QUANTITÉ de bacilles ensemencés en milligrammes	NOMBRE DE COLONIES après trente-neuf jours			
	Témoin	Traités par SO^4H^2 à 10 p. 100	Traités par SO^4H^2 à 15 p. 100	Traités par SO^4H^2 à 20 p. 100
0,001	Innombrables.	Innombrables.	Innombrables.	Innombrables.
0,000.1 . . .	»	210	97	70
0,000.01. . .	150	150	70	35

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — Par contre, une expérience similaire pratiquée exactement dans les mêmes conditions que la précédente, mais en remplaçant l'acide sulfurique par l'acide acétique laissé en contact pendant une demi-heure, a donné les résultats suivants :

QUANTITÉ de bacilles ensemencés en milligrammes	NOMBRE DE COLONIES après trente-quatre jours				
	Témoins	Traités par l'acide acétique à			
		5 p. 100	10 p. 100	15 p. 100	20 p. 100
0,001.	Innombrables.	0	0	0	0
0,000.1. . . .	»	0	0	0	0
0,000.01	206	0	0	0	0

QUATRIÈME EXPÉRIENCE. — Dans cette expérience, nous avons étudié l'action des deux acides directement sur le sang en nous plaçant dans les mêmes conditions que dans la pratique courante de l'hémoculture et, dans ce but, nous avons procédé ainsi. Après avoir décanté le plasma de sang humain appartenant à un malade indemne de toute lésion tuberculeuse et non allergique, nous avons réparti 45 cent. cubes du sédiment sanguin dans neuf tubes à essais stériles, à raison de 5 cent. cubes par tube. D'autre part, nous avons préparé trois dilutions de bacilles (souche humaine Ratti âgée de quinze jours cultivée sur pomme de terre glycinée) en sérum physiologique contenant 1/10.000, 1/100.000 et 1/1.000.000 de milligramme de corps microbiens par centimètre cube. A trois tubes contenant 5 cent. cubes du culot globulaire on additionne 1 cent. cube de l'émulsion au 1/100.000, à trois autres tubes 1 cent. cube de l'émulsion au 1/100.000 et aux trois derniers tubes 1 cent. cube de l'émulsion au 1/1.000.000. Avec les neuf tubes ainsi préparés, nous avons fait trois séries d'expériences.

Série A. — A trois tubes contenant des dilutions croissantes de 1/10.000 à 1/100.000 de milligramme de bacilles par centimètre cube, on ajoute 40 cent. cubes d'acide acétique à 10 p. 100 et, immédiatement après, on transvase le sédiment sanguin dans un godet métallique qu'on remplit avec 200 cent. cubes d'eau distillée stérile. Après trois lavages, centrifugations et décantations successifs, le culot dilué dans 1 cent. cube d'eau physiologique est ensemencé sur six tubes de milieu à l'œuf, trois de Löwenstein et trois de Petragani à l'asparagine.

Série B. — Trois tubes contenant des dilutions identiques aux précédentes sont traités avant le lavage par l'acide acétique pendant une demi-heure, dans les mêmes conditions que pour la série A.

Série C. — Le culot sanguin des trois tubes restants, débarrassé de son hémoglobine par deux lavages et centrifugations successifs à l'eau distillée stérile, est traité par 2 cent. cubes d'une solution d'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant trois minutes. On lave et on centrifuge jusqu'à élimination de l'acide et on ensemence. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant :

QUANTITÉ de bacilles ensemencés en milligrammes	NOMBRE DE COLONIES après dix-neuf jours			
	Témoins	Acide acétique 1 minute	Traités par l'acide acétique 1/2 heure	Traités par SO ⁴ H ² 3 minutes
0,000.1	50	42	0	83
0,000.01	17	3	0	5
0,000.001	1	0	0	1

Il ressort de ces expériences que la nocivité de l'acide sulfurique à des concentrations de 10 à 40 p. 100 laissé en contact avec des émulsions denses de bacilles de mammifères (jusqu'à 1/10 de milligramme par centimètre cube) pendant une demi-

heure est pratiquement nulle. C'est seulement aux concentrations de 30 à 40 p. 100 que l'action de l'acide sulfurique sur les bacilles devient nettement nuisible, à la condition de prolonger ce traitement pendant quarante-cinq à soixante minutes.

Avec des émulsions contenant 1/100 à 1/1.000 de milligramme de bacilles par centimètre cube, l'acide sulfurique à 40 p. 100 se montre parfaitement inoffensif tandis que l'acide acétique déjà à la concentration de 5 p. 100 exerce une action empêchante totale sur le développement du bacille de Koch. Ce même phénomène a été observé en étudiant comparative-ment l'effet de ces deux acides sur des sangs humains artificiellement infectés.

Ces expériences nous ayant permis de conclure à la grande toxicité de l'acide acétique contrastant avec la tolérance de l'acide sulfurique pour le bacille tuberculeux des mammifères, nous avons voulu vérifier si ces mêmes faits s'observaient pour les souches d'origine aviaire et pour les bacilles acido-résistants saprophytes.

Pour ces expériences, nous avons suivi la même technique que celle employée pour le bacille des mammifères.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — *Action de l'acide sulfurique sur le bacille aviaire.* — Le 16 avril 1934, nous avons préparé dans du liquide de Sauton dilué au quart, avec une souche d'origine aviaire (Ten..., culture sur pomme de terre glycinée âgée de quatorze jours) des émulsions contenant de 0,001 à 0 milligr. 00001 de bacilles par centimètre cube. Ces dilutions furent ensuite mises en contact avec de l'acide sulfurique à 5, 10, 15 et 20 p. 100 pendant une demi-heure. Le tableau ci-dessous contient les résultats de cette expérience.

QUANTITÉ de bacilles ensemencés en milligrammes	NOMBRE DE COLONIES après trente jours				
	Témoins	Traités par l'acide sulfurique à			
		5 p. 100	10 p. 100	15 p. 100	20 p. 100
0,001	Innombrables.	Innombrables.	400	75	40
0,0001	Innombrables.	400	95	75	23
0,00001	Innombrables.	300	73	80	25

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — *Action de l'acide acétique sur le bacille aviaire.* — Dans une expérience similaire, pratiquée dans les mêmes conditions que

précédemment, mais en remplaçant l'acide sulfurique par l'acide acétique qu'on laissait en contact pendant une demi-heure, les résultats ont été les suivants :

QUANTITÉ de bacilles ensemencés en milligrammes	NOMBRE DE COLONIES après trente jours				
	Témoins	Traités par l'acide acétique à			
		5 p. 100	10 p. 100	15 p. 100	20 p. 100
0,001	Innombrables.	109	0	0	0
0,0001	Innombrables.	67	0	0	0
0,00001	Innombrables.	50	0	0	0

Les deux tableaux précédents montrent que l'action toxique exercée par l'acide sulfurique sur les souches de bacilles aviaires est sensiblement identique sur les souches de bacilles des mammifères. Par contre, l'acide acétique employé à la concentration de 5 p. 100, à laquelle il empêche complètement le développement des bacilles tuberculeux des mammifères, ne devient nettement nocif pour les souches de bacilles, aviaires qu'à la concentration de 10 p. 100.

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — Nous avons fait une nouvelle série d'expériences suivant la technique précédente, mais en remplaçant la souche de bacilles aviaires par une souche de bacilles paratuberculeux. Les émulsions microbiennes effectuées à partir d'une culture de pomme de terre glycinée âgée de quinze jours (souche Bla...) ont été laissées en contact pendant une demi-heure.

QUANTITÉ de bacilles ensemencés en milligrammes	NOMBRE DE COLONIES après trente jours				
	Témoins	Traités par l'acide sulfurique à			
		5 p. 100	10 p. 100	15 p. 100	20 p. 100
0,001	Innombrables.	25	0	0	0
0,0001	200	0	0	0	0
0,00001	150	0	0	0	0

QUATRIÈME EXPÉRIENCE. — *Action de l'acide acétique sur le bacille paratuberculeux.* — La même expérience effectuée avec l'acide acétique employé

à des concentrations décroissantes de 20 à 5 p. 100 pendant une demi-heure a donné les résultats consignés ci-dessous :

QUANTITÉ de bacilles ensemencés en milligrammes	NOMBRE DE COLONIES après trente jours				
	Témoins	Traités par l'acide acétique à			
		5 p. 100	10 p. 100	15 p. 100	20 p. 100
0,001	Innombrables.	46	6	0	0
0,0001	Innombrables.	3	0	0	0
0,00001	Innombrables.	4	0	0	0

Ces deux dernières expériences révèlent l'action nettement toxique de l'acide sulfurique sur le bacille paratuberculeux en opposition avec celle exercée par l'acide acétique sur les émulsions bacillaires à 0 milligr. 001 par centimètre cube qui ont résisté à la concentration de 10 p. 100.

Il ressort de ces recherches que si les souches de bacilles tuberculeux aviaires se comportent vis-à-vis de l'acide sulfurique sensiblement de la même manière que les souches de bacilles des mammifères, par contre l'acide acétique s'est révélé moins toxique que pour ces derniers. Un effet contraire a été observé en étudiant comparativement l'action de ces deux acides sur les bacilles paratuberculeux; ici l'acide sulfurique s'est montré nettement toxique tandis que l'acide acétique, même à la concentration de 10 p. 100, permettrait le développement des bacilles paratuberculeux saprophytes. Ces faits viennent à l'appui des constatations de Cohn qui avait aussi observé que l'acide acétique à la concentration employée par Lœwenstein dans sa technique d'hémoculture du bacille de Koch est tout à fait inoffensif pour les bacilles saprophytes.

De plus, ces expériences nous permettent de conclure que l'acide acétique, très toxique pour les souches de bacilles tuberculeux des mammifères, l'est moins pour le bacille aviaire et plus du tout pour les souches de bacilles paratuberculeux que nous avons étudiées.

Le choix de l'acide sulfurique a donc un autre avantage qui

consiste à supprimer les pullulations de bacilles paratuberculeux saprophytes qui, dans nos premières recherches, en employant comme agent d'hémolyse l'acide acétique, viciaient nos résultats positifs macroscopiques d'emblée dans 30 p. 100 des cas.

Dans ces recherches, nous n'avons pas pu constater l'action empêchante de l'hémoglobine comme l'affirme Læwenstein. Dans des expériences en collaboration avec Sadettin, nous avons étudié l'influence du sang *in toto*, et celle de chaque fraction (plasma, globules rouges, sérum citraté du sang humain normal ou de malade tuberculeux, de mouton, de lapin normal ou vacciné par le BCG ou tuberculeux) sur le développement des bacilles cultivés dans le milieu de Sauton. Nous sommes ainsi parvenus à des résultats différents suivant la souche de bacilles tuberculeux ensemencée. En effet, pour le BCG, nous avons observé que la quantité de corps microbiens développés dans 125 cent. cubes de liquide de Sauton restés pendant vingt-cinq jours à l'étuve à 38° était sensiblement la même que dans les ballons auxquels on avait ajouté 1 à 5 cent. cubes de sang provenant de sujets sains ou tuberculeux, de moutons et de lapins neufs ou vaccinés par le BCG ou infectés avec des bacilles virulents. Nous avons cependant remarqué une action nettement favorisante de l'extrait globulaire préparé selon la formule de Legroux. Le poids des corps microbiens développés par ballon témoin et pesés à l'état sec a été en moyenne de 1 gr. 40, tandis que les ballons ayant reçu 1 à 5 cent. cubes d'extrait globulaire ont donné 1 gr. 60 à 1 gr. 70 de bacilles dans les mêmes conditions.

En ce qui concerne les cultures de bacilles du type bovin, si l'extrait globulaire et le sang de lapin tuberculeux ou vacciné avec le BCG et de mouton ne se sont pas révélés nettement favorisants, par contre le sang de sujets sains ou atteints de tuberculose, le sang de lapin et de mouton s'est montré empêchant pour le développement de la souche employée (souche Vallée).

Pour les souches de bacilles humains (Ratti) ou aviaires (Aviaire IV), nous avons constaté que le sang et l'extrait globulaire favorisent nettement la culture de ces types. Nous

avons eu des séries où le développement des corps microbiens en Sauton au sang a atteint presque le double de celui des ballons témoins.

Ces recherches nous permettent de conclure que si l'action du sang pour la souche de Calmette et Guérin est indifférente, dans certaines conditions il s'est révélé empêchant pour le développement des bacilles d'origine bovine. Au contraire, en ce qui concerne les souches d'origine humaine ou aviaire, nos observations sont tout à fait opposées à celles de Læwenstein, puisqu'elles nous ont montré que le sang favorise la culture de ces types bacillaires.

Des constatations identiques aux nôtres ont été faites par Ninni et Bretey sur ce même sujet. En outre, il nous est arrivé d'obtenir un développement très abondant de belles colonies de bacilles de type humain dans tous les tubes ensemencés directement, sans préparation préalable, avec le sang liquide total extrait du cœur d'un sujet mort de tuberculose chronique évolutive.

D'autre part, nous avons réalisé une expérience qui prouve que, contrairement aux dires de Læwenstein, l'hémoglobine est loin d'empêcher le développement du bacille de Koch, même si on l'extrait directement du sang de sujets morts de tuberculose.

Après avoir flambé à l'aide d'un brûleur le péricarde mis à nu d'un cœur de malade tuberculeux qui nous fut apporté par le D^r Perrault, nous en avons ouvert aseptiquement le ventricule et l'oreillette droits et nous sommes tombés sur un volumineux caillot constitué de deux parties nettement différenciées par leur couleur. La partie supérieure *blanche* occupait environ un tiers du volume, et la partie inférieure *rouge* les deux autres tiers. Les frottis de ces deux parties montrent que le caillot blanc ne renfermait que des globules blancs et de la fibrine, tandis que la partie rouge-noire était composée presque exclusivement de globules rouges et de fibrine avec quelques rares leucocytes.

Nous avons alors prélevé à l'aide d'instruments stériles, changés pour chaque opération, 1 gramme, pesé à la balance, de la partie supérieure (caillot blanc) et 1 autre gramme de la partie inférieure (caillot rouge), qui ont été mis séparément

dans des mortiers stériles. Chaque caillot fut coupé en fins morceaux puis broyé avec du sable. On traita ensuite les produits ainsi préparés par 2 cent. cubes d'acide sulfurique à 15 p. 100 pendant quinze minutes. Puis on neutralisa en présence de tournesol (réactif indicateur) avec une solution de soude à 30 p. 100. Chaque caillot futensemencé entièrement sur 6 tubes de milieu de Lœwenstein à raison de 1/2 cent. cube par tube. Voici les résultats obtenus :

Dans les tubesensemencés avec le caillot rouge, il s'est développé au total 109 colonies de bacilles tuberculeux de type humain, tandis que dans ceuxensemencés avec le caillot blanc il n'y en eut que 39 dans le même temps (trente jours).

Une deuxième expérience, effectuée avec un autre cœur de sujet tuberculeux (Joquet), dans les mêmes conditions que précédemment, nous a donné :

Caillot rouge	19 colonies.
Caillot blanc	2 colonies.

Ces faits ont été confirmés par les inoculations au cobaye.

En effet, en nous plaçant dans les mêmes conditions, les cobayes qui avaient reçu le caillot rouge ont fait une tuberculose mortelle à marche beaucoup plus rapide que ceux inoculés avec le caillot blanc.

Ces deux expériences et d'autres semblables que nous avons faites depuis avec Costil démontrent que, contrairement à ce qu'a dit Lœwenstein, l'hémoglobine n'exerce aucune action empêchante sur le développement du bacille de Koch, puisque ce sont les fragments de caillot rouge-noir qui ont toujours fourni le plus grand nombre de colonies. Elles apportent, en outre, la preuve que, au rebours de ce qu'ont écrit quelques auteurs qui s'étaient crus autorisés à admettre que, dans le sang circulant, le bacille de Koch devait être cantonné dans les leucocytes, c'est au contraire en dehors de ceux-ci qu'ils sont le plus nombreux. Il est, du reste, expérimentalement établi que lors des surinfections — et c'est le cas pour le sang des sujets tuberculeux — le principal élément de défense qui intervient vis-à-vis des bacilles tuberculeux introduits dans l'organisme est représenté par les éléments cellulaires du système réticulo-endothélial. Dans le sang circulant, ces éléments ne sont

qu'en nombre relativement minime : 1 à 3 p. 100, ceci explique pourquoi on rencontre beaucoup plus de bacilles dans la portion rouge-noire du caillot, représentant la masse totale du sang, que dans la portion blanche qui n'est qu'une de ces fractions.

Nous venons de prouver que l'action prétendue empêchante de l'hémoglobine pour le bacille de Koch n'existe pas. Nous pensons que l'avantage du traitement préalable du culot d'ensemencement préconisé par Lœwenstein est dû à ce qu'on arrive à extraire par ce procédé, d'une grande masse de sang, une très petite quantité de dépôt. Alors les bacilles, s'il en existe, se trouvent mis en contact intime avec le milieu de culture, de sorte qu'on peut déceler des *unités bacillaires*, ce qu'il est impossible d'obtenir lorsqu'on ensemence directement le sang.

Avant d'appliquer la méthode à la clinique humaine, nous avons infecté artificiellement, avec une dilution allant du 1/10.000 au 1/1.000.000 de milligramme, des sangs de sujets sains et de malades tuberculeux.

Ces sangs ont été ensemencés à des époques différentes, selon la méthode de Lœwenstein, et ils ont donné par la suite de très belles cultures, avec sensiblement le même nombre de colonies par tube que les témoins.

Analysons maintenant les résultats que nous avons obtenus en appliquant la technique de Lœwenstein à la recherche de la bacillémie dans la clinique humaine.

Le nombre total d'hémocultures pratiquées pour contrôler cette méthode est, à l'heure actuelle, de 700, soit 4.200 tubes ensemencés, étant donné que, pour chaque échantillon de sang, nous avons utilisé 6 tubes.

Nous diviserons cet exposé en deux parties. Dans la première, nous ferons état de 200 cultures faites avec le sang de sujets atteints de rhumatisme, de maladies nerveuses telles que la démence précoce et d'autres maladies à étiologie obscure, mais supposées d'origine tuberculeuse — comme la névrite rétrobulbaire, la sclérose en plaques — et d'affections oculaires ou cutanées diverses.

Dans la plupart des cas de ce groupe, le culot de sang a été divisé en deux parties : une moitié était ensemencée sur 6 tubes

de milieu à l'œuf asparagine-vert-malachite suivant la technique préconisée par Lœwenstein, tandis que l'autre, diluée dans 3 cent. cubes d'eau physiologique, était inoculée par voie sous-cutanée à 2 cobayes.

Nous avons ainsi étudié :

1° Le sang de 90 malades atteints de diverses formes de rhumatisme, aigu ou chronique, mono- ou polyarticulaire, dont la plupart réagissaient à la tuberculine. Les échantillons de sang provenaient du service clinique du D^r Coste, à l'hôpital Cochin.

2° Le sang de 41 déments précoces des services des professeurs Claude et Laignel-Lavastine (Salpêtrière) et de M^{lle} Pascal (Asile de Maison-Blanche).

3° Le sang de 69 sujets atteints de diverses maladies supposées d'origine tuberculeuse des services des professeurs Pautrier, Laignel-Lavastine, Morax et du D^r Coste.

Sur les 90 cas du premier groupe, 10 seulement ont été étudiés par hémoculture, 20 par hémoculture et inoculation et les 60 restants par inoculation. Nous ferons remarquer que les animaux ainsi inoculés ont été observés pendant un laps de temps variant de cinq à neuf mois. Tous ont été éprouvés périodiquement à l'intradermo-réaction à la tuberculine (1/10 de tuberculine brute diluée au 1/10).

Pour les cas de démence précoce, nous avons effectué dans 14 cas l'ensemencement, dans 17 cas l'ensemencement et l'inoculation simultanés et dix fois l'inoculation seulement. En ce qui concerne l'inoculation des produits aux cobayes, nous avons suivi la même technique que précédemment.

Parmi les 69 échantillons du troisième groupe, 15 ont été ensemencés, 40 ensemencés et inoculés parallèlement au cobaye, 14 inoculés toujours selon la même technique.

Les résultats ont été les suivants :

En aucun cas, la présence de bacilles acido-alcoolo-résistants n'a pu être décelée dans les frottis colorés de culots de sangs de tuberculeux avérés, de rhumatisants ou de déments précoces.

L'ensemencement des sangs du premier groupe n'a jamais donné lieu au développement de cultures macroscopiques. Tous les tubes sont demeurés stériles même après un délai de trois mois. Quatre fois seulement, nous avons obtenu par inoculation

un résultat positif avec une forme spéciale de tuberculose que nous discuterons dans la deuxième partie, quand nous traiterons des résultats obtenus par l'ensemencement du sang de tuberculeux avérés.

Les échantillons de sang appartenant à des malades atteints de démence précoce ont donné des résultats négatifs aussi bien par ensemencement que par inoculation au cobaye. L'étude de dix liquides céphalo-rachidiens provenant de sujets atteints de la même maladie a abouti au même échec.

L'inoculation et l'ensemencement des sangs du troisième groupe ont été complètement négatifs.

Ajoutons que pour lesensemencements de ce groupe le produit de raclage des tubes examiné dans les délais prescrits par Løwenstein nous a fait découvrir assez souvent des bacilles acido-résistants en amas par l'examen direct. Ces microcolonies, réensemencées et inoculées au cobaye, n'ont, en aucun cas, donné de cultures macroscopiques ni tuberculisé les animaux sensibles à la tuberculose. Comme nous le verrons plus loin, la présence de ces microcolonies non repiquables et non tuberculigènes ne suffit pas pour affirmer la nature tuberculeuse des produits suspects.

Nous allons exposer dans cette seconde partie les résultats de 500 hémocultures pratiquées chez des tuberculeux avérés. La plupart étaient atteints de tuberculose pulmonaire aiguë ou chronique dont le diagnostic clinique avait été confirmé par la présence de bacilles de Koch dans l'expectoration. Les autres présentaient des formes diverses de tuberculose osseuse, cutanée ou osseuse; le diagnostic avait été posé par l'examen radiographique, les réactions sérologiques ou l'inoculation de produits suspects au cobaye.

Le résultat de nos 300 premières hémocultures a déjà été communiqué à la Société de Biologie en 1931; nous avons alors obtenu 18 cultures de bacilles acido-résistants, soit 6 p. 100, tandis qu'avec les derniers 200 échantillons nous n'avons enregistré que 8 résultats positifs, soit 4 p. 100. Nous n'avons obtenu que dans 9 cas des colonies macroscopiques d'emblée avec le sang des 500 malades étudiés. Nous devons signaler que pour ces cultures macroscopiques, sur les 6 tubes ensemencés chaque fois, nous avons obtenu un développement

sept fois dans 1 seul tube et deux fois dans 2 tubes. Ces colonies ont apparu dans 1 cas le douzième jour, dans 2 cas, dix-neuf jours après et dans tous les autres cas entre vingt-neuf et quarante jours après l'ensemencement. Dans 17 cas, nous avons obtenu des microcolonies décelables seulement dans les frottis colorés au Ziehl.

Une fois seulement, ces microcolonies ont donné lieu au développement de colonies macroscopiques par réensemencement sur le milieu de Lœwenstein.

De même nous avons obtenu, neuf jours après l'ensemencement d'un sang, une microcolonie non repiquable mais dont le raclage, émulsionné en sérum physiologique et inoculé au cobaye, a tuberculisé cet animal, nous permettant d'isoler de sa rate une souche de bacilles tuberculeux de type humain (A. F.).

En ce qui concerne les types de bacilles isolés, nous avons réussi à identifier jusqu'ici, par les réactions biologiques et par l'inoculation aux animaux : trois fois des bacilles présentant les caractères des *paratuberculeux*, une fois un bacille du type *aviaire* isolé du sang d'un malade atteint de tuberculose ostéo-articulaire (J.) et dans les autres cas des bacilles du type *humain* isolés de tuberculoses osseuses ou pulmonaires. Nous conservons encore à l'étude, depuis deux ans, un groupe particulier de bacilles acido-résistants dont la dissociation spontanée en plusieurs variantes de colonies nous permettra peut-être bientôt d'être fixé sur leur signification.

Sur les 9 souches dont nous avons obtenu des colonies macroscopiques d'emblée, 3 correspondaient à des bacilles paratuberculeux, ce qui réduit de 30 p. 100 notre total et ramène à 1,2 p. 100 les résultats positifs obtenus directement par culture macroscopique.

Ces 3 souches provenaient de malades atteints de diverses formes d'infection tuberculeuse typique, pulmonaire, osseuse ou cutanée, et nous avons chaque fois ensemencé 6 tubes de milieu de Lœwenstein. Pour 2 de ces malades, la culture est devenue visible après douze jours (souche Bl.) et après cinquante-trois jours (souche Pr.) seulement sur un seul tube. Pour le troisième (Ya.), les colonies ont apparu dans 2 tubes après trente-huit jours.

Les caractères de ces 3 souches étaient les suivants :

Sur milieu de Lœwenstein à l'œuf-asparagine, petites colonies blanches, porcelainées, saillantes et mamelonnées, non pigmentées, légèrement humides. Réensemencées sur le même milieu, elles ont formé une couche continue, granuleuse, épaisse, ne se différenciant des bacilles du type mammifère que par le développement plus rapide des cultures-filles: celui-ci était complet en dix à douze jours.

Les 3 souches poussèrent difficilement et lentement dans les premières cultures sur milieux non glycélinés, puis, après plusieurs mois, elles finirent par s'y adapter. Dès les premiers réensemencements on put constater qu'elles croissaient entre 20° et 42°, mais que la température optima était pour elles comprise entre 32° et 35°. Encemencées en bouillon glycéliné, celui-ci reste clair; aucun pigment ne diffuse dans le liquide. Après plusieurs jours apparaît un voile blanc, plissé, qui adhère aux parois du tube. Sur le milieu de Petragnani modifié par substitution de l'asparagine à la peptone et sur pomme de terre glycélinée, les cultures sont complètement développées en douze à quinze jours d'étuve, et ont le même aspect que celles du bacille tuberculeux du type mammifère.

Inoculées sous la peau, dans le péritoine ou dans les veines de lapins, cobayes, rats et souris, les 3 souches ne produisent aucune lésion. La poule est indifférente aux doses massives injectées dans le péritoine ou dans les veines. Sous la peau du cobaye, 5 à 10 milligrammes déterminent une adénite de voisinage ou un abcès local qui guérit spontanément après quelques semaines, et dont le pus montre des bacilles acido-résistants très nombreux. Parfois on trouve un ganglion sous-lombaire volumineux, contenant des bacilles vingt à trente jours après l'inoculation, mais jamais de pus caséux. Les viscères sont toujours indemnes et les nodules que produit l'injection intrapéritonéale de 1 à 10 milligrammes chez le cobaye disparaissent totalement en soixante à quatre-vingt dix jours. L'injection intraveineuse de 1 à 10 milligrammes est inoffensive. Les fortes doses provoquent seulement un peu d'hypertrophie passagère du foie et de la rate.

Par leurs caractères biologiques et par l'absence totale de propriétés pathogènes, il est évident que ces 3 souches doivent être considérées comme appartenant au groupe des bacilles

paratuberculeux. Ce fait est confirmé par l'étude que nous avons effectuée de leurs fonctions antigènes et toxiques. Nos recherches sur ce groupe de bacilles paratuberculeux nous ont amené à nous demander si les bacilles ainsi isolés provenaient bien du sang des malades ou d'une contamination accidentelle pendant les manipulations. Nous avons écarté la deuxième hypothèse et nous la considérons comme peu vraisemblable, parce que les souches obtenues diffèrent totalement, par leur aspect et par certains de leurs caractères, de celles des paratuberculeux qui se trouvent dans le laboratoire. C'est en raison de ces constatations que nous croyons pouvoir affirmer leur origine hématogène.

D'ailleurs Læwenstein, Tiedmann, Popper et Lydia Rabinowitsch ont confirmé nos résultats en arrivant à des conclusions identiques.

En ce qui concerne la souche de bacille aviaire isolée par nous, bien que les recherches de Læwenstein à ce sujet soient déjà anciennes (1910) et qu'il en ait été publié de semblables par d'autres auteurs, certains expérimentateurs, se basant sur les recherches de Lichtenstern et surtout sur celles de Paltauf qui a trouvé dans des œufs du commerce un pourcentage de 10 p. 100 contaminés, se sont demandé si les œufs que nous employions pour fabriquer nos milieux de culture ne contenaient pas des bacilles acido-résistants qu'un chauffage insuffisant aurait épargnés. Cette objection n'avait pas échappé à M. Calmette, à M. Boquet et à moi-même. Nous avons donc jugé indispensable d'élucider ce point. Or, le raclage et les frottis de plusieurs centaines de tubes de milieu à l'œuf non ensemencés ne nous ont jamais révélé la présence de bacilles acido-résistants.

D'autre part, nous avons incorporé au milieu à l'œuf, avant de le coaguler, des bacilles paratuberculeux, des bacilles aviaires et des bacilles de mammifères du type *bovin* à la dose de 1 milligramme par centimètre cube. Nous avons chauffé une partie des tubes à 75° pendant une demi-heure une seule fois; une autre série à 85° à deux reprises pendant une demi-heure et à vingt-quatre heures d'intervalle; une troisième série a été chauffée trois fois à 75° pendant une demi-heure à vingt quatre heures d'intervalle. Nous avons porté ces tubes à l'étuve à 38°

et nous les avons observés pendant trois mois. Sur 150 tubes, aucun n'a présenté de culture macroscopique. De plus, pour le bacille des mammifères nous avons broyé notre milieu qui n'avait pas donné de culture macroscopique après trois mois et nous avons inoculé ce produit de broyage à un lot de cobayes. Ces animaux, observés pendant quatre mois, n'ont jamais réagi à la tuberculine et, sacrifiés, n'ont présenté aucune trace de tuberculose à l'autopsie. S'il existe une cause d'erreur dans les résultats obtenus par la méthode de Lœvenstein, nos recherches nous permettent donc d'affirmer qu'elles ne proviennent certainement pas du milieu de culture.

Quant aux résultats reconnus positifs par « microcolonies » seulement, ils ont donné lieu à des discussions et interprétations diverses. Il ne faut pas oublier à ce sujet les expériences déjà anciennes de Cornet, Meyer, Gottstein et Kahn et celles plus récentes de Wilson et Schwabacher qui nous ont mis en garde contre l'interprétation des examens microscopiques de sédiments sanguins, démontrant que les particules des membranes des hématies et les granulations leucocytaires, à cause de leur richesse en lipoides, sont acido-résistantes, et que leur grande similitude avec le bacille de Koch, tant par leur forme que par leur constitution chimique, peut donner lieu à de grossières erreurs, faits que nos recherches sur ce point ont pleinement confirmés.

Et surtout, il importe de nous mettre en garde contre la fréquence des bacilles saprophytes acido-résistants dans les divers produits chimiques, réactifs colorants, utilisés par les travailleurs des laboratoires où l'on s'occupe de tuberculose.

Ces constatations et d'autres faits déjà bien connus relatifs aux précautions qu'il faut prendre avec l'huile de cèdre, les lentilles frontales des objectifs à immersion, les lames porte-objets, les solutions de matières colorantes, etc..., nous portent à penser qu'il a dû fréquemment arriver que de tels éléments bacillaires, simplement colorés au Ziehl pour l'examen direct, ont été confondus avec de véritables bacilles tuberculeux.

De notre côté, nous avons pu déceler des bacilles acido-résistants saprophytes dans l'eau physiologique et dans l'eau distillée non stérilisée. Les expériences faites avec Costil que nous rap-

portons ci-dessous montrent nettement l'ubiquité des bacilles acido-résistants.

Nous avons raclé avec un bistouri neuf et stérilisé l'intérieur de 10 tuyaux de caoutchouc dits antigicleurs adaptés aux robinets d'eau froide de 10 laboratoires du service des recherches sur la tuberculose. Ces produits de raclage ont été délayés séparément, dans des godets coniques neufs et stériles, préalablement lavés à l'alcool et l'éther. Les émulsions ainsi obtenues ont été ensuite centrifugées et décantées, puis les culots furent étalés sur des lames neuves et colorés au Ziehl-Neelsen. Les résultats de cet examen ont été les suivants : dans un cas, *très nombreux amas de bacilles acido-résistants*, le champ microscopique en est littéralement couvert : dans 6 cas, nombreux amas de bacilles acido-résistants : dans 1 cas, quelques amas et dans le dernier aucun bacille acido-résistant visible (1).

La même recherche pratiquée sur les antigicleurs des robinets à eau chaude a montré une fois de très nombreux amas de bacilles acido-résistants, quatre fois de nombreux amas, deux fois quelques amas ; dans 2 cas, l'examen a été négatif.

L'ensemencement du culot des godets correspondant aux antigicleurs des robinets à eau froide par la méthode que nous avons préconisée pour l'isolement des produits suspects secondairement infectés nous a permis d'obtenir à deux reprises des cultures de bacilles acido-résistants, pigmentés dans un cas et non pigmentés de couleur blanc nacré dans l'autre. L'absence totale de propriétés pathogènes pour le cobaye, le lapin et la poule de ces 2 souches et leurs caractères biologiques nous ont permis de les classer parmi les bacilles paratuberculeux.

En présence de ces résultats, nous avons voulu savoir si les bacilles paratuberculeux trouvés provenaient réellement du caoutchouc des antigicleurs souillés par des poussières de l'air ou d'une contamination de l'eau du robinet. La deuxième hypothèse a été confirmée par l'expérience suivante : 50 cent. cubes d'eau pris directement à un robinet sans antigicleur sont centrifugés pendant une demi-heure dans des godets stériles. On rejette ensuite une partie du liquide et on traite les quelques

(1) Dans certains cas, la présence des acido-résistants est tellement abondante qu'un simple examen direct après coloration au Ziehl-Neelsen suffit pour les déceler et en très grand nombre.

centimètres cubes restants (3 cent. cubes environ) par l'acide sulfurique à 15 p. 100; on neutralise et on ensemence sur 6 tubes de milieu à l'œuf-asparagine, à raison de 1/2 cent. cube par tube. 3 de ces tubes déposés à l'étuve sont demeurés stériles après un délai de trois mois. Par contre, les 3 autres laissés à la température du laboratoire ont donné lieu quarante-cinq jours plus tard au développement de colonies blanc nacré de bacilles acido-alcool-résistants. Ces bacilles se sont nettement montrés avirulents pour les animaux de laboratoire.

D'autres recherches nous ont fait découvrir des cadavres de bacilles acido-résistants dans notre eau distillée et dans notre liquide de Sauton *stériles*. La présence de ces germes s'explique par ce fait que les billes de verre ou d'acier et la grenaille de plomb employées pour le nettoyage de la verrerie de nos laboratoires retiennent à leur surface des acido-résistants morts provenant des manipulations antérieures. On les y retrouve souvent en très grand nombre et ils restent fixés sur les parois des ballons ou passent dans le contenu liquide de ces vases.

Ces constatations nous ont convaincu que les microcolonies non repiquables recueillies par raclage des tubes de milieu ensemencés avec du sang sont le plus souvent constituées par de simple amas de cadavres de bacilles acido-résistants apportés par les divers liquides employés pour le traitement préalable des produits ensemencés.

Nous pensons que dans les recherches concernant l'isolement du bacille de Koch à partir du sang, dans l'avenir, il ne faut tenir compte que des microcolonies cultivables par réensemencement et de celles qui se montrent tuberculeuses pour le cobaye ou le deviennent après passage sur cet animal.

*
* *

Nous avons donné, comme résultat global de nos 500 hémocultures, 18 résultats positifs pour nos 300 premiers ensemencements effectués, soit 6 p. 100, tandis que les 200 derniers échantillons ensemencés n'ont donné que 8 résultats positifs, soit 4 p. 100, ce qui correspond à une moyenne de 5,2 p. 100 au total. Or, nous avons comparé les résultats de nos recherches avec ceux publiés après les nôtres jusqu'à maintenant par

AUTEURS	NATURE DE LA MALADIE	NOMBRE des hémocultures	
		effectuées	positives
Abt.	Tuberculoses diverses.	20	4
Armand-Delille et Manseau. . .	Tuberculoses pulmonaires.	15	1
Besseau	Tuberculoses diverses.	60	2
Bingold et Spier	Tuberculoses diverses.	15	0
Bruynoghe et Adant	Tuberc. graves évolutives.	8	3
Busson.	Tuberculoses diverses.	150	26
Cohn.	Tuberculoses diverses.	28	0
Cummings	Tuberculoses avérées.	15	0
D'Antona.	Tuberculoses diverses.	30	0
Deist.	Tuberculoses diverses.	231	3
Dettling	Tuberc. diverses et non tuberc.	115	0
Dimtza et Guscher.	Tuberculoses pulmonaires.	11	1
Di Natale.	Tuberculoses pulmonaires.	112	9
Domingo.	Tuberculoses certaines.	192	8
Ederle et Kriech	Tuberculoses miliaires.	4	2
Ederle et Kriech	Tuberculoses pulmonaires	30	2
Eichbaum	Tuberc. pulmonaires très avancées.	20	0
Giannetti.	Tuberculoses diverses.	23	0
Hager	Tuberculoses diverses.	163	17
Haymaker, Ekhardt et Freund	Tuberculoses diverses.	38	0
Haymaker, Ekhardt et Freund.	Maladies diverses.	13	0
Huttig	Tuberculoses pulmonaires.	59	7
Izard et Thiry	Divers tuberculeux avérés.	13	0
Jontofsohn.	Tuberculoses pulmonaires.	41	3
Jontofsohn.	Tuberculoses chirurgicales	9	0
Kadish.	Tuberculoses diverses.	66	0
Kallos	Tuberculoses diverses.	37	0
Koch.	Tuberculoses diverses.	25	0
Lang.	Tuberculoses diverses.	91	4
Lévin.	Tuberculoses pulmonaires.	140	2
Lichtenstern	Tuberc. rénales débutantes.	3	1
R. et S. Mach.	Tuberculoses pulmonaires.	60	6
Manteufel	Tuberculoses diverses.	30	0
Mathiesen	Tuberculoses diverses.	51	7
Muggia.	Tuberc. diverses et non tuberc.	4	0
Nanu, Jonesco et Stefanescu.	Tuberc. pleuro-pulmonaires.	21	2
OEkonomopoulo et collab.	Tuberc. diverses et non tuberc.	18	0
Oro.	Tuberc. diverses et non tuberc.	27	4
Paraf et Abaza.	Tuberculoses pulmonaires.	52	2
Pollak	Tuberculoses diverses.	35	5
Popper et collaborateurs.	Tuberculoses diverses.	228	11
Rabinowitsch.	Tuberculoses pulmonaires.	212	10
Richter.	Tuberculoses diverses.	43	3
Saegler.	Tuberculoses diverses.	158	11
Schreiner	Tuberculoses diverses.	29	0
Schwabacher.	Tuberc. pulmonaires et chroniques.	11	1
Sergent, Durant, Gaspard, Marcoux.	Tuberculoses diverses.	30	5
Shapiro.	Tuberculoses diverses.	167	7
Unverricht et Dosquet.	Tuberculoses diverses.	91	4
Urbanek et Meller	Diverses maladies des yeux.	70	1
Walter et Horing.	Tuberc. diverses et non tuberc.	91	0
Weatherill.	Tuberculoses pulmonaires.	30	0
		3.264	174

Pourcentage : 49 auteurs, 5,33; A. Saenz : 5,2.

49 auteurs de divers pays. Nous les résumons dans le tableau que l'on trouvera à la page précédente.

Ce tableau montre que 49 expérimentateurs différents, qui ont pratiqué ensemble 3.264 *hémocultures* selon la méthode de Læwenstein avec le sang de malades atteints de diverses formes de tuberculose, ont obtenu 174 *résultats positifs*, soit 5,33 p. 100. Il est donc impressionnant de constater la concordance de ces chiffres avec les nôtres et la discordance qu'ils présentent avec ceux indiqués par Læwenstein et ses collaborateurs.

Ce tableau montre également que les résultats négatifs indiqués par Bingold, Cohn, Cumings, d'Antona, Eichbaum, Giannetti, Izard, Kallos, Koch, Manteufel, Muggia, Schreiner et Weatherail et d'autres auteurs sont basés sur un nombre insuffisant de cas examinés et ne permettent pas de porter un jugement sur la valeur réelle de la méthode dont il s'agit.

Nous avons cherché à nous rendre compte de la signification de la bacillémie en clinique humaine en faisant une enquête, pour chaque hémoculture positive obtenue, auprès du clinicien qui nous avait fourni l'échantillon de sang. D'après les renseignements qui nous ont été ainsi communiqués, nous pouvons ranger nos résultats positifs en quatre catégories, en faisant abstraction du cas où nous avons isolé un bacille aviaire (1).

Disons d'abord que la plupart des résultats obtenus correspondent à des primo-infections de l'enfant et de l'adolescent. Ensuite viennent les cas relatifs à des tuberculoses aiguës en pleine évolution et à issue fatale. Après cela, nous avons obtenu des résultats positifs dans des formes diverses de tuberculose chronique dont l'hémoculture positive correspondait à une nouvelle localisation ou à une poussée évolutive de la maladie (cas A. F..., professeur Sayé, cas V..., Dr Soulié).

(1) Nous ferons simplement remarquer, sans en tirer aucune conclusion, que, pour notre cas d'hémoculture positive à bacille aviaire (malade J...) le professeur Sayé nous a communiqué le diagnostic clinique de tuberculose ostéo-tarsienne articulaire en période fébrile. Or, en inoculant un cobaye par voie sous-cutanée dans l'aîne avec un bacille aviaire, nous avons pu reproduire chez cet animal des ostéo-arthrites à marche torpide, desquelles nous avons isolé, deux ans après l'inoculation, le bacille aviaire en culture pure. Il est frappant de constater que chez deux espèces considérées comme peu réceptives ou réfractaires au bacille aviaire, on puisse trouver ce germe dans des processus anatomo-pathologiques analogues.

En dernier lieu, nos résultats positifs les moins favorables provenaient d'autres malades atteints de formes variées de tuberculose chronique.

Ces résultats positifs sont en complet accord avec ceux que nous avons obtenus en ensemençant le sang du cœur de sujets après la mort. Nous avons eu deux résultats positifs sur quatre échantillons de sang provenant de formes aiguës de tubercules évolutives, tandis que nous avons seulement noté un seul résultat positif sur 20 échantillons de sang provenant de malades morts de formes diverses de tuberculose chronique. Ces constatations concordent avec celles de Abt, Long, Rabinowitsch et surtout de Popper, Bodart et Schindler, qui ont réussi à déceler dix-huit fois le bacille de Koch en cultivant le sang du cœur de 24 sujets morts de tuberculose progressive mortelle, tandis que l'ensemencement du sang du cœur provenant de 64 malades qui avaient succombé en présentant des formes diverses de tuberculose chronique non évolutive n'a donné qu'un résultat positif.

Nous avons pratiqué une fois l'ensemencement du sang d'un malade atteint de tuberculose chronique dans la période préagonique, et de celui du cœur du même sujet après sa mort. Dans ces deux circonstances nous avons eu un résultat négatif. Par contre, nous avons obtenu deux résultats positifs en partant du sang d'un sujet vivant et du caillot sanguin du cœur du même sujet ayant succombé à une tuberculose septicémique évolutive.

L'opinion de Walter et Horing, prétendant que le sang vivant exercerait une influence inhibitrice sur le bacille tuberculeux, tandis que celle-ci manquerait dans le sang de sujets morts, ne se trouve donc pas confirmée. Tous ces faits démontrent, au contraire, que la bacillémie est en relation étroite avec la forme anatomo-clinique de la maladie et que le bacille, quand il existe, est aussi facilement décelable dans le sang circulant que dans celui des cadavres.

Les faits qui précèdent montrent aussi que la recherche de la bacillémie en clinique humaine n'aurait une réelle importance pour le diagnostic que dans les *primo-infections*, où la dissémination bacillaire est précoce, c'est-à-dire où elle se produit avant l'apparition de l'allergie et de tout autre signe

de tuberculose décelable par les divers examens cliniques. C'est d'ailleurs un des grands avantages de cette méthode pour l'avenir, de pouvoir diagnostiquer la maladie et de nous éclairer, en même temps, par la bacillémie, sur la durée de la période anté-allergique. D'après ce que notre expérimentation nous a appris et d'après nos recherches sur l'hémoculture chez les chimpanzés et chez l'enfant nouveau-né prémunis par voie buccale avec une seule dose massive de BCG, nous savons qu'il est possible de déceler la présence de ce bacille-vaccin d'emblée en culture pure quatre à six heures après l'ingestion.

Nous nous étions appliqués à effectuer ces recherches avec notre regretté maître, M. Calmette, et avec L. Costil, en nous adressant à des enfants choisis dans le service de M. Weill-Hallé, à la pouponnière de Médan.

Voici les résultats, déjà très concluants, de nos premières expériences.

5 nourrissons, non allergiques à la tuberculine et respectivement âgés de neuf mois et demi (Mal...), six mois et demi (Tou...), douze mois (Beau...), vingt-deux mois (Mai. .), deux ans (Da...), reçoivent, par voie buccale, une dose unique de BCG; d'abord Mal... et Tou..., le 20 juin 1933. Les 3 autres, Beau..., Ma ..., Dan..., le 20 juillet suivant.

L'histoire clinique brièvement résumée de chacun de ces enfants est la suivante :

OBSERVATION I. — Mal... (fillette). Poids à la naissance : 3 kilogr. 700. Une sœur aînée morte à six mois de péritonite bacillaire. Admise à la pouponnière à cinq mois et demi, après une période de troubles digestifs. Poids : 4 kilogr. 200. Très chétive et anémiée lorsqu'on lui fait ingérer 4 centigrammes de BCG le 20 juin 1933, à neuf mois et demi. Poids : 6 kilogr. 500. Les 6 et 7, 30 et 31 août, légères ascensions de température (38°). Progression de poids remarquable malgré une période de chaleurs excessives. Le 20 septembre, pèse 7 kilogr. 450. Cuti-réaction négative.

Obs II. — Tou... (garçon). Poids à la naissance : 3 kilogr. 400. Admis à cinq mois à la pouponnière, ne pesant que 4 kilogr. 900. A six mois et demi, après un modeste gain de 250 grammes, on lui fait absorber par voie buccale, le 20 juin, 3 centigrammes de BCG. A partir du 3 juillet, il présente une température de 38°5, puis des oscillations de 39 à 40°, jusqu'au 15 juillet. Du 15 au 31, la température revient à 38°. Etat général bon. Le poids progresse de 400 grammes. Du 2 au 11 août, nouvelle ascension à 39° avec stagnation de poids. Température normale du 25 au 29 août. A ce moment, l'enfant fait une otite aiguë avec ascension brutale à 41° et l'enfant succombe en vingt-quatre heures. Pendant tout le mois d'août, l'enfant fut

hospitalisé aux Enfants-Malades. A la même époque, d'autres enfants de la pouponnière ont également présenté des épisodes fébriles prolongés, dus à une infection coli-bacillaire mise en évidence chez ces derniers par le sondage et l'examen des urines. Ces examens n'avaient pas été pratiqués chez Tou... La cuti-réaction, pratiquée chaque mois, est demeurée négative.

Oss. III. — Beau... (garçon). Poids à la naissance, en juillet 1932, 2 kilogr. 380; admis à la pouponnière à six mois. Pèse 4 kilogr. 500. A douze mois, le 20 juillet 1933, absorbe, par voie buccale, 3 centigrammes de BCG. Pèse alors 6 kilogr. 800. Légère ascension thermique les 23 et 24 août (38°). Bon état général. Pèse 7 kilogr. 450 le 30 septembre. La cuti-réaction, d'abord négative, devient positive le 17 septembre.

Oss. IV. — Mai... (fille). Prématurée de sept mois, pèse 1 kilogr. 800 à la naissance. Mère bacillaire morte peu après son accouchement. A huit mois, pèse 5 kilogr. 500. Très anémiée, pâleur cirreuse. A vingt-deux mois pèse 8 kilogr. 900. C'est alors que le 20 juillet 1933 elle ingère 3 centigrammes de BCG. Légères ascensions thermiques du 26 juillet au 1^{er} août, puis du 4 au 8 août. A cette époque de chaleurs excessives, baisse légère de poids : 8 kilogr. 680. Le 23 septembre, l'enfant a bon aspect. Pèse 9 kilogr. 050. A deux ans, mesure 0 m. 82 et a 16 dents. La cuti-réaction est restée négative.

Oss. V. — Dan... (garçon). Poids à la naissance : 3 kilogr. 100. Troubles digestifs pendant les premiers mois. Entre à la pouponnière à quatorze mois. Poids : 6 kilogr. 220. En janvier 1933, à dix-huit mois, ne pèse que 7 kilogr. 200. En mai, 7 kilogr. 600. Le 20 juillet, ingère 3 centigrammes de BCG. Poids à cette date : 7 kilogr. 410, en baisse depuis mars. Légères ascensions thermiques à 38°3, le 27 juillet, 38°6 le 12 et le 15 août. L'état général s'améliore sensiblement. Le 23 septembre, le poids atteint 8 kilogr. 950. Les cuti-réactions restent négatives.

Aux deux premiers enfants (Mal... et Tou...), on a prélevé, cinq heures après l'ingestion du BCG, environ 5 cent. cubes de sang par ponction de la jugulaire. Aux trois autres le même prélèvement a été fait trois heures après l'ingestion du vaccin. Ce sang a été rendu incoagulable par mélange immédiat avec 2 cent. cubes d'une solution stérile de citrate de soude à 10 p. 100. Après décantation du plasma, on a pris, de chaque échantillon, 2 cent. cubes du dépôt de leucocytes et d'hématies, qu'on a hémolysés dans un volume égal d'eau distillée. 3 cent. cubes de ce mélange ont été répartis entre 6 tubes de milieu de Lœwenstein à raison de 0 c. c. 5 par tube. Le reste de chaque prise, traité par l'acide sulfurique à 10 p. 100, fut, après centrifugation et lavage du culot, ensemençé dans les mêmes conditions.

Sur les cinq échantillons de sang ainsi étudiés, nous avons obtenu trois résultats positifs (enfants Tou..., Mal... et Dan...)

et, chaque fois, l'identification des colonies a montré qu'elles étaient constituées par du BCG pur.

Ces colonies, très nombreuses pour l'un des échantillons, sont devenues macroscopiquement visibles dix à douze jours après l'ensemencement pour tous les cas positifs. Cette précocité de l'apparition des colonies macroscopiques démontre, comme on devait s'y attendre, qu'il s'agit, non de bacilles qui se seraient déjà multipliés dans le sang, mais de bacilles provenant du vaccin ; dans ces conditions, l'hémoculture est comparable à un réensemencement direct d'une culture de BCG.

L'hémoculture, après traitement par l'acide sulfurique, s'est révélée supérieure à l'ensemencement direct du sang hémolysé par l'eau distillée. La première a fourni deux fois plus de résultats positifs que la seconde.

Une expérience semblable a été faite sur deux chimpanzés récemment arrivés à notre laboratoire et qui ont ingéré en une seule dose 1 *gramme* de BCG. Quatre heures après, on a fait à chacun d'eux une prise de sang et l'ensemencement de celui-ci fut positif pour l'un et pour l'autre.

Ces faits démontrent que l'absorption des bacilles-vaccins s'effectue très rapidement par la muqueuse intestinale, puisque ces bacilles peuvent être mis en évidence par l'hémoculture dans le sang circulant entre trois et cinq heures après l'ingestion unique. La proportion d'hémocultures positives que nous avons ainsi obtenues (60 p. 100 chez les nourrissons, 100 p. 100 chez les chimpanzés) est vraiment impressionnante.

Pour l'un de nos nourrissons, dont l'hémoculture avait été positive cinq heures après l'ingestion du vaccin, une seconde prise de sang, effectuée dix jours plus tard, donna une hémoculture négative. Il est donc vraisemblable que la bacillémie qui survient très rapidement après l'arrivée des bacilles-vaccins dans le tube digestif n'a qu'une durée brève et que, peu d'heures après, les bacilles sont fixés dans les organes lymphatiques où ils se cultivent et où ils déterminent ces légers engorgements ganglionnaires (micro-polyadénie) qui apparaissent et persistent souvent pendant quelques jours ou quelques semaines chez les enfants vaccinés.

Ces recherches montrent que rien ne s'oppose à ce que, par analogie, dans les primo-infections des nourrissons, l'hémo-

culture puisse être positive avant l'apparition de toute allergie.

En dehors de ces cas très particuliers, l'hémoculture paraît n'avoir qu'une valeur pronostique, indiquant une issue fatale dans les formes aiguës et évolutives, accusant une réactivation des foyers dans les formes chroniques, chaque fois qu'une embolie microbienne entraînée par la circulation est assez importante pour créer une nouvelle localisation de la maladie à distance.

D'après ces données, comme l'a fait très judicieusement remarquer le professeur Sergent à la tribune de l'Académie de Médecine, pour résoudre les problèmes que pose la bacillémie en clinique humaine, il serait nécessaire d'établir une collaboration étroite entre le clinicien averti et le biologiste, pour pouvoir déterminer les conditions de passage du bacille de Koch dans le sang, ainsi que sa fréquence, en relation avec chaque forme anatomique ou clinique de la maladie.

C'est ainsi que, fort de ces constatations, mettant en pratique cette collaboration de la clinique et du laboratoire, le D^r Broca, assistant du professeur Debré, a réussi dans notre laboratoire, sur 14 cas de primo-infection tuberculeuse chez de jeunes enfants et des nourrissons, à déceler cinq fois le bacille de Koch du type humain par culture directe du sang ou par inoculation au cobaye.

Il est à remarquer que le caractère fondamental de la bacillémie décelable par l'hémoculture est d'être toujours paucibacillaire. En effet, sur les six tubesensemencés chaque fois, nous n'avons constaté le développement de quelques colonies que sur un tube, deux tout au plus. Nous sommes arrivés à des conclusions identiques dans des expériences que nous avons effectuées sur la valeur diagnostique comparée de l'inoculation et de l'hémoculture qui nous ont permis, en collaboration avec Coste et Costil, de décrire une forme particulière de tuberculose chez les cobayes inoculés avec des spécimens de sang suspect.

Les caractères essentiels de la tuberculose développée chez les cobayes inoculés avec du sang suspect peuvent se résumer ainsi : absence de chancre d'inoculation ainsi que d'adénites inguinale et lombaire correspondantes ; longue durée de la période anté-allergique et grande lenteur de l'évolution de

la maladie qui, dans plusieurs cas observés, n'a été constatée que cinq à huit mois après l'inoculation. Ces faits sont superposables à ceux que nous a appris l'infection paucibacillaire expérimentale du cobaye (inoculé avec des doses de 1/1.000.000 et de 1/10.000.000 de milligramme de bacilles) et à propos desquels nous avons fait des remarques analogues. L'inoculation au cobaye, réalisée à l'abri de toute contamination spontanée, s'est montrée dans ces conditions plus sensible que l'ensemencement du sang sur les milieux de culture, car elle est capable de déceler de rares éléments bacillaires. Mais il est nécessaire de prolonger l'observation des animaux inoculés pendant au moins huit mois, peut-être même beaucoup plus, et de ne considérer les résultats comme négatifs que si les animaux ne réagissent pas à la tuberculine après un long délai.

Ces faits viennent d'être confirmés par les D^{rs} Broca et Perrault dans 6 cas de primo-infection de l'enfance et de l'adulte dont voici brièvement résumées les observations cliniques et la forme particulière de tuberculose développée chez les cobayes inoculés avec ces échantillons de sang.

OBSERVATION I. — Pic... (garçon), douze ans. Fébrile. 20 cent. cubes de sang citraté recueillis aseptiquement par ponction veineuse, sont inoculés, le 12 novembre 1932, à 4 cobayes par voie sous-cutanée. 2 de ces animaux ayant reçu chacun 5 cent. cubes de sang, l'un mort de maladie intercurrente cinq mois après, l'autre sacrifié quatorze mois après, éprouvés périodiquement sans avoir jamais réagi à l'intradermo-réaction, se montrèrent à l'autopsie indemnes de toutes lésions suspectes. Les 2 cobayes restants, éprouvés comme précédemment à la tuberculine, commencèrent à réagir respectivement cinq et sept mois après l'inoculation ; pour tous deux, la réaction devint nécrotique au cours du neuvième mois. Ces animaux furent sacrifiés à cette époque. Voici les constatations faites à l'autopsie : absence de chancre et d'abcès au point d'inoculation, ganglions inguinaux et sous-lombaire normaux, foie et rate hypertrophiés avec nodules tuberculeux, ganglions trachéo-bronchiques très hypertrophiés et caséeux, lésions de broncho-pneumonie tuberculeuse bilatérales, discrètes, contenant des bacilles acido-résistants. La rate, préalablement broyée, inoculée à un cobaye, l'a tué en trente-six jours avec chancre d'inoculation et signes caractéristiques de tuberculose classique.

Obs. II. — Piq... (garçon), dix-huit mois. Cuti-réaction positive intense. Lésions complexes parahilaires à droite. Enfant hypotrophique. Le 27 octobre 1932, on lui prélève 10 cent. cubes de sang qu'on inocule, en parties égales, à 2 cobayes par voie sous-cutanée. Un de ces cobayes est encore en vie quinze mois après l'inoculation ; éprouvé périodiquement à la tuberculine,

il n'a jamais réagi. Le deuxième cobaye commença à réagir à l'intradermo-réaction à la tuberculine après sept mois ; au bout de huit mois, la réaction était nécrotique. L'animal mourut neuf mois après l'inoculation, présentant à l'autopsie des lésions pulmonaires et spléniques identiques à celles que présentaient les cobayes du cas précédent, ni chancre, ni abcès, ni adénite inguinale ou lombaire correspondant à la région inoculée. Du ganglion trachéo-bronchique, qui présentait des bacilles acido-résistants à l'examen direct, on a pu isoler une souche de type humain.

Obs. III. — Bui .. (garçon), sept ans, cuti-réaction positive nécrotique. Foyer de pneumonie tuberculeuse au poumon droit avec adénopathie cervicale. On prélève, en période fébrile, 15 cent. cubes de sang qu'on inocule le 28 juin 1933, par voie sous-cutanée, à 3 cobayes, qui devinrent allergiques et moururent de tuberculose généralisée évolutive cinq à six mois après l'inoculation. L'ensemencement de leurs organes permit d'isoler une culture de bacilles tuberculeux de type humain.

Obs. IV et V. — Ray... Bus... (garçon), huit ans et demi et sa sœur Mic... Bus..., cinq ans. Le père de ces enfants fait une hémoptysie au mois d'août 1933 et reste fébrile, entre 39° et 40°, pendant vingt jours. Quelque temps après les enfants sont envoyés à la campagne. Le garçon rentrant le 15 septembre présente, d'après les renseignements donnés par sa mère, un très mauvais état général : amaigrissement, élévation de température, 38° le matin et 38°5 le soir. Spléno-pneumonie du poumon droit avec scissurite.

Le 11 décembre, sa sœur tombe malade présentant 38°3 de fièvre et montre à la radiographie un foyer de pneumonie tuberculeuse à droite ; la cuti-réaction est nécrotique. On prélève au garçon 10 cent. cubes de sang citraté qu'on inocule le 11 octobre 1933 à 4 cobayes dont 2 meurent de maladie intercurrente respectivement vingt jours et trois mois après l'inoculation. Quant aux deux autres, l'un réagissant positivement à la tuberculine après trois mois est encore en vie, l'autre fut sacrifié, étant également allergique, deux mois après. Les lésions présentées par cet animal étaient identiques en tous points à celles des cobayes positifs du cas précédent.

6 cobayes inoculés avec le sang total de la sœur de cet enfant, Mic. Bus..., le 12 décembre 1933, devinrent tous allergiques un mois après l'inoculation.

De son côté, le D^r Perrault, dans un cas où l'hémoculture avait été négative, a obtenu une tuberculose très lente du cobaye décelable huit mois après l'inoculation avec absence de chancre et réaction cutanée très tardive, dans une primo-infection tuberculeuse, chez une jeune femme de vingt-deux ans qui guérit dans la suite sous l'influence d'un traitement crysalbinique.

Ces expériences prouvent que l'inoculation du sang se montre plus sensible que l'ensemencement sur les milieux de culture, pour déceler de rares éléments bacillaires à condition, comme nous l'avons déjà dit, de prolonger l'observation pendant un temps suffisant et de ne considérer les résultats comme

négatifs que si les animaux ne réagissent pas à l'intradermo-réaction à la tuberculine après un long délai.

Cette nouvelle technique nous avait déjà permis avec Coste et Costil de déceler la bacillémie dans 4 cas de rhumatisme tuberculeux dont il a été question dans la première partie de ce mémoire. Deux de ces cas que nous rapportons ci-dessous sont particulièrement intéressants.

20 cent. cubes de sang citraté du premier malade (M. R.), atteint de rhumatisme chronique d'allure tuberculeuse, sont inoculés, le 29 décembre 1931, à 3 cobayes par voie sous-cutanée. Deux de ces cobayes, ayant reçu 5 cent. cubes chacun, sont morts de maladie intercurrente, l'un après cinq jours, et l'autre après dix-huit jours. Le troisième, inoculé avec 10 cent. cubes de sang, fut éprouvé périodiquement par intradermo-tuberculination; il commença à réagir sept mois après l'inoculation; la réaction devint nécrotique au cours du neuvième mois. Sur l'animal, sacrifié à cette date (28 septembre 1932), voici nos constatations d'autopsie : absence de chancre et d'abcès au point d'inoculation, ganglions inguinaux et sous-lombaires normaux. Ganglions trachéo-bronchiques très hypertrophiés (pois chiche) et caséux; lésions de broncho pneumonie tuberculeuses discrètes, bilatérales, contenant des bacilles acido-résistants; rate légèrement hypertrophiée sur laquelle on voit deux nodules contenant également des bacilles acido-résistants. Ces organes inoculés au cobaye l'ont tué en soixante jours avec chancre d'inoculation et signes classiques de la tuberculose évolutive.

Le deuxième cas concerne un malade âgé de soixante-trois ans (M. B.), bronchitique et rhumatisant chronique. Lors d'un accès de fièvre (39°), on prélève 20 cent. cubes de sang qu'on inocule à dose égale à 2 cobayes par voie sous-cutanée. Un de ces cobayes est mort de pneumococcie sept mois après l'inoculation. Eprouvé périodiquement à la tuberculine, il n'a jamais réagi. Le deuxième cobaye commença à réagir à l'intradermo-réaction huit mois après l'inoculation. La réaction devint nécrotique le neuvième mois et l'animal fut sacrifié le 20 septembre 1932. Lésions pulmonaires et spléniques identiques à celles du cobaye précédent; ni chancre, ni abcès, ni adénite dans la région inoculée; ganglions trachéo-bronchiques très virulents pour les cobayes auxquels ils furent inoculés.

La forme de tuberculose développée chez les cobayes inoculés avec des échantillons de sang paucibacillaire nous a permis de constater certains faits dont l'importance nous paraît grande; ils nous font comprendre pourquoi il arrive si souvent, chez les enfants par exemple, que l'allergie ne se manifeste que fort longtemps après qu'une infection paucibacillaire soit réalisée.

Ces expériences que nous poursuivons actuellement montrent de plus que le sang pur, simplement rendu incoagulable par le citrate de soude, inoculé au cobaye immédiatement après la prise de sang (sans dépasser la dose de 5 cent. cubes par voie

sous-cutanée), donne, contrairement aux craintes de Løwenstein, bien plus souvent et plus sûrement des résultats positifs que la culture pratiquée d'après la méthode de l'auteur viennois. C'est dans ce sens qu'il convient d'orienter, désormais, les recherches sur la bacillémie tuberculeuse.

Nous sommes convaincu d'après ce que nous ont appris nos expériences sur les animaux que la bacillémie, du moins chez les malades atteints de formes évolutives de tuberculose, est beaucoup plus fréquente que ne l'indiquent les résultats de nos recherches. Il faudra pour la mettre en relief plus souvent dans la clinique humaine l'étroite collaboration que nous demandons aux cliniciens et aux bactériologistes comme nous l'avons fait dans la primo-infection de l'enfance où la bacillémie a pu être décelée avec une fréquence insoupçonnée jusqu'à maintenant.

BIBLIOGRAPHIE

- ABT. *Schweiz. Med. Woch.*, n° 45, 1931.
 ARMAND-DELILLE et MANSEAU. *La Presse Médicale*, n° 38, 1922, p. 761.
 BACMEISTER et RUEBEN. *Deut. Med. Woch.*, n° 50, décembre 1912.
 BEERENS. *C. R. Soc. de Biol.*, 108, juin 1933, p. 696.
 BERNARD (Léon), DREBRÉ et BARON. *Ann. de Méd.*, n° 2, février 1914.
 BESSAU. *Med. Klin.*, 1932, p. 411.
 BINGOLD et SPIER. *Münch. Med. Woch.*, 1931, p. 1899.
 BOQUET, VALTIS et SAENZ. *Ces Annales*, 46, 1931.
 BRUYNOGHE et ADANT. *C. R. Soc. de Biol.*, 1932.
 BUSSON. *Wien. klin. Woch.*, 1931, p. 407.
 CALMETTE, WEILL-HALLÉ, SAENZ et COSTIL. *Bull. de l'Acad. de Médec.*, 110, n° 32, 17 octobre 1933.
 COHN. *Med. Klin.*, 1932, p. 411; *Journ. of Inf. Dis.*, 214, mars-avril 1933.
 COSTE et SAENZ. *Bull. et Mém. de la Soc. méd. des Hôp. de Paris*, 1931.
 COSTE, VALTIS et VAN DEINSE. *Bull. de l'Acad. de Méd.*, 109, n° 22, juin 1933, p. 760.
 D'ANTONA. *Giorn. Batt. e Immun.*, vol. VI, n° 6, 1931.
 DETIS. *Zeit. für Tuberk.*, 67, 1932.
 DETTLING. *Münch. Med. Woch.*, avril 1932, p. 540.
 DINTZA et GUSCHER. *Münch. Med. Woch.*, n° 48, novembre 1932, p. 1917.
 DI NATALÀ. *Giorn. di Batt. e Immun.*, 9, n° 3, 1932, p. 476.
 DOMINGO. *C. R. Soc. de Biol.*, 108, 1931, p. 619.
 DRESEN. *Med. Klin.*, 3 juin 1913.
 EDERLE et KRILCH. *Deut. Med. Woch.*, 58, 1932, p. 7.
 EICHBAUM. *Zeit. f. immunitätsforsch.*, 74, 1932, p. 31.
 ELSÄSSER. *Beit. zur Klin. der Tuberk.*, 26, 4, p. 1913.
 FISCHER. *Zeit. f. Tuberk.*, 58, 1930, p. 331.

- FISCHER et URGOITI. *Beitr. Klin. Tuberk.*, 76, p. 484.
 GIANNETTI. *Boll. Istit. Sieroterap. Milan*, 1931.
 GODSTEIN. *Beit. z. Klin. der Tuberk.*, 28, n° 2, 1913, p. 283.
 GRIFFITH (Stanley). *Journ. of Pathol. and Bact.*, 35, 1932.
 HAGER. *Med. Klin.*, 1932, p. 253.
 HAKN. *Münch. Med. Woch.*, 60, 1913, p. 845.
 HAYMAKER, EKHART et FREUND. *Journ. Inf. Dis.*, 51, 1932, p. 562.
 HUTTIG. *Zeit. f. Tuberk.*, 62, p. 35.
 IZARD et THIRY. *Toulouse méd.*, 32, n° 24, novembre 1931.
 JÉRUSALEM et URGOITI. *Med. Klin.*, 1931, p. 769.
 JONOFSON. *Zeit. f. Tuberk.*, 61, 1931, p. 35.
 KADISCH. *Med. Klin.*, 1932, p. 111.
 KALLOS. *Münch. Med. Woch.*, 1931, p. 1901.
 KISSMEYER et LÖWENSTEIN. *Münch. Med. Woch.*, 1932, p. 626.
 KOCH. *Deut. Med. Woch.*, 1932, p. 90.
 KONRAD. *Wien. Klin. Woch.*, n° 14, 1932.
 KRAUSE. *Ibid.*, 54, 1929, p. 227.
 KREN et LÖWENSTEIN. *Wien. Klin. Woch.*, n° 13, 1931; *Klin. Woch.*, n° 21, 1931.
 LANG. *Med. Klin.*, 1932, p. 290.
 LÉVIN. *Mordiskt. Med. Tidskrift.*, 1932.
 LICHTENSTEIN. *Münch. Med. Woch.*, 1931, p. 471.
 LICHTENSTEIN. *Münch. Med. Woch.*, 1931, p. 471.
 LÖWENSTEIN. a) *Deut. Woch.*, 1930, p. 1010; b) *Zentrabl. f. Bakt., I Orig.*, 1931, p. 120-127; c) *Med. Klin.*, 1932, p. 254; d) *Zeit. f. Tuberk.*, 1932, p. 64-120; *Zeit. f. Tuberk.*, 42, p. 3; *Münch. Med. Woch.*, 1930, p. 1522 et 1662; *Acta Poed. Scand.*, 11, p. 187; *Münch. Med. Woch.*, 1931, p. 261 et 1078; *Münch. Med. Woch.*, 1931, p. 1080; *Med. Klin.*, 1931, p. 1669; *Ces Annales*, 50, n° 2, 1933, p. 161; *Le Monde Médical*, 43^e année, n° 822, janvier 1933.
 LÖWENSTEIN et RUSEFF. *Wien Klin. Woch.*, 1930, p. 10.
 LONG. *Amer. Rev. of Tuberc.*, 9, 1914, p. 215.
 MACH (R. et S.). *C. R. Soc. de Biol.*, 109, 1932, p. 722.
 MANTEUFEL. *Med. Klin.*, 1932, p. 112.
 MASSOL et BRETON. *C. R. Soc. de Biol.*, 74, 1913, p. 26 et 75, p. 455.
 MATHIESEN. *Med. Klin.*, n° 8, 1928; *Deut. Med. Woch.*, n° 46, 1932.
 MEYER. *Med. Klin.*, 1932, p. 110 et 291.
 NANU, JONESCO et STEFANESCO. *La Presse Médicale*, 1934.
 NINNI et BRETEY. *C. R. Soc. de Biol.*, 1933.
 NOBÉCOURT et DARRE. *Soc. Et. Scient. sur la Tuberc.*, novembre 1912.
 OËKONOMOPOYLO, PAPANIKOLAOU et JOANNIDÈS. *Zeit. f. Tuberk.*, 62.
 ORO. *Policlinico*, 1931, p. 1207.
 PALTAUF. *Commun. alla Soc. di Med. Int. di Vienna. Med. Klin.*, 1932, p. 19.
 PARAF et ABABA. *Rev. critique de Path. et de Thérap.*, 3^e année, n° 6, 1932.
 PERRAULT. *Thèse de Paris*, 1934, Legrand, édit.
 POLLAK. *Med. Klin.*, 1931, p. 1146.
 POPPER. *Deut. Med. Woch.*, 1932, p. 89; *Med. Klin.*, 1932, p. 290.
 POPPER, BODART et SCHINDLER. *Wien. Klin. Woch.*, 1931, p. 1494; *Deut. Med. Woch.*, 58, 1932.
 QUERNER. *Münch. Med. Woch.*, février 1933.
 RARINOWITSCH. *Med. Klin.*, 1932, p. 113.
 RAVENEL et SCHMIDT. *State Med. Soc. of Wisconsin*, 30 janvier-2 juillet 1909.

- REITTER et LOEWENSTEIN. *Wien. Klin.*, 1932, p. 293.
- RICHTER. *Beil. Klin. d. Tuberk.*, 79, p. 110.
- RIST, ARMAND-DELILLE et LÉVY-BRUHL. *Soc. d'Et. scient. sur la Tuberc.*, avril 1913.
- ROSENBERGER. *Münch. Med. Woch.*, février 1913.
- SAENZ. *C. R. Soc. de Biol.*, juillet 1931, p. 134 ; *La Médecine*, n° 7, 13^e année mai 1932 ; *Revue de la Tuberc.*, 13, n° 5, mai 1932, 3^e série, p. 317 ; *La Presse Médicale*, n° 59, juillet 1932, p. 1161 ; *Progresos de la Clínica*, 40, année XX, n° 249, septembre 1932, p. 501, Madrid ; *C. R. Soc. de Biol.*, 112, n° 5, novembre 1933, p. 343 ; *Revue de Phtisiologie médico-sociale*, 19, n° 1, janvier 1933, p. 20.
- SAENZ, CHEVALLIER, LÉVY-BRUHL et COSTIL. *C. R. Soc. de Biol.*, 112, n° 10, mars 1933, p. 951.
- SAENZ, COSTE et COSTIL. *C. R. Soc. de Biol.*, 111, n° 40, 1932, p. 934.
- SAENZ et COSTIL. *C. R. Soc. de Biol.*, 110, n° 28, juillet 1932, p. 1189 ; *C. R. Soc. de Biol.*, 111, n° 38, décembre 1932, p. 770 ; *C. R. Soc. de Biol.*, 112, n° 12, 1933 ; *C. R. Soc. de Biol.*, 113, mai 1933, p. 50 ; *C. R. Soc. de Biol.*, 1933, p. 698 ; *C. R. Soc. de Biol.*, 8 juillet 1933.
- SAENZ, COSTIL et SADETTIN. *C. R. Soc. de Biol.*, 115, mars 1934, p. 1175.
- SAENZ et EISENDRATH. *C. R. Soc. de Biol.*, 109, n° 14, avril 1932, p. 1260 ; *Ces Annales*, 49, n° 5, novembre 1932, p. 608 ; *La Presse Médicale*, n° 99, décembre 1932, p. 1856.
- SAENZ et GUERRA. *C. R. Soc. de Biol.*, 108, n° 33, novembre 1931, p. 715.
- SAENZ et MANSEAU. *C. R. Soc. de Biol.*, 109, n° 12, avril 1932, p. 1115.
- SAENZ, SADETTIN et COSTIL. *C. R. Soc. de Biol.*, mai 1934.
- SCHREINER. *Wien. Klin. Woch.*, n° 15, 1932, p. 488.
- SCHWABACHER. *Lancet*, 1931, p. 1130.
- SERGEANT, DURANT, GASPARD et MARCOUX. *C. R. Soc. de Biol.*, 1932.
- SHAPIRO. *Amer. Rev. of Tuberc.*, vol. XXVI, n° 4, 1932 ; *Zeit. f. Tuberk.*, vol. LXVI, n° 3-4, 1932, p. 248.
- TIEDMANN. *Beit. zur Klin. der Tuberk.*, vol. LXXXII, fasc. 6, 1933.
- UNVERRICHT et DOSQUET. *Zeit. f. Tuberk.*, 62, p. 338.
- URBANÉK et MELLER. *Zeit. f. Augenheilk.*, 77, 1932, p. 17.
- DE VERBIZIER. *Soc. d'Et. scient. sur la Tuberc.*, 12 décembre 1912 ; *Revue de Médecine*, n° 3, mars 1913, p. 161.
- WALTER et HÖRING. *Mediz. Klin.*, 1932, p. 688.
- WEATHERAIL. *Lancet*, 222, 1932, p. 980.
- WESSELY et LOEWENSTEIN. *Wien. Klin. Woch.*, 1930.

ESSAIS D'IMMUNISATION PAR INHALATION

I. — DIPHTÉRIE ET TÉTANOS.

par W. SILBERSCHMIDT.

(Institut d'Hygiène de l'Université de Zurich.)

Nos procédés d'immunisation se sont multipliés et perfectionnés dans le courant de ces dernières années.

L'application de l'antigène sur la peau légèrement scarifiée est encore la méthode de choix pour la vaccination antivariolique, malgré ses imperfections et ses dangers.

L'injection parentérale a le grand avantage de diminuer les dangers d'infection et de permettre le dosage de l'antigène ; appliquée avec les précautions nécessaires elle permet d'éviter les infections secondaires telles qu'on les observe après les scarifications superficielles. Bien que le nombre des accidents soit minime en comparaison de la quantité d'injections pratiquées, nous ne voulons pas oublier que les infections graves et même les décès dus à une asepsie insuffisante sont encore à l'ordre du jour et que le contrôle de la stérilité du liquide à injecter ne doit jamais être négligé.

Besredka est d'avis que, pour obtenir l'immunité, l'injection sous-cutanée n'est pas la méthode de choix, vu que l'antigène injecté sous la peau n'a qu'une action locale limitée. D'après lui, l'immunité est basée sur l'affinité de l'antigène pour un organe ou pour des cellules déterminées. Ce savant préconise l'application superficielle, l'injection en nappe ou l'ingestion de l'antigène.

Besredka recommande aussi l'emploi de compresses humides d'antivirus, soit sur la peau intacte, soit sur des plaies ouvertes ; la vaccinothérapie établie sur ce principe compte de nombreux adeptes. Nous savons que l'absorption d'antigène à travers la peau est possible, et que la perméabilité est favorisée par l'humidité.

Löwenstein conseille l'application de l'antigène diphtérique sous forme de pommade par frictions répétées sur la peau intacte. Son procédé n'a pas encore trouvé beaucoup de partisans; quelques expériences effectuées dans notre laboratoire ne nous ont pas convaincu de l'efficacité de sa méthode.

Les muqueuses sont généralement considérées comme plus perméables que la peau, tant pour les agents pathogènes que pour les antigènes de toute sorte. Citons comme exemple les instillations sur la conjonctive et sur la muqueuse nasale. Neufeld a étudié l'immunisation antipneumococcique par la voie nasale.

Nous ne connaissons pas encore exactement la voie de pénétration de l'antigène ingéré par la bouche. Besredka admet l'existence d'une barrière bucco-pharyngo-stomacale; l'absorption de bile verte serait capable de neutraliser cette barrière et de permettre l'absorption de l'antigène. La perméabilité de la muqueuse intestinale diminue avec l'âge; Calmette immunise le nouveau-né par la voie buccale parce qu'il admet, avec Behring, que l'antigène pénètre facilement dans l'organisme par cette voie.

Un autre procédé m'occupe depuis un certain temps, c'est l'*immunisation par inhalation*.

Les poumons sont capables d'absorber des quantités relativement grandes de liquide. D'après Heubner, 20 cent. cubes d'eau introduits dans le poumon d'un lapin de 1 kilogr. 1/2 sont résorbés en grande partie (86 p. 100) en neuf minutes et entièrement en une heure et demie. Peiper réussit à injecter 250 cent. cubes d'eau dans la trachée d'un chien dans l'espace d'une heure par doses successives de 30 à 50 cent. cubes. La résorption des substances dissoutes dans le liquide injecté s'effectue dans le poumon comme à la surface d'une séreuse et non comme dans l'intestin. Wasbutzky a déjà constaté en 1879 que le curare et la strychnine agissent beaucoup plus rapidement en injection intrapulmonaire que sous-cutanée. Heubner a également observé que le chlorure de calcium pénétrait plus rapidement dans le sang par la voie trachéale que par injection sous la peau. L'insuline n'est pas résorbée par l'intestin, mais par les alvéoles pulmonaires. Facile entre les mains d'un spécialiste expérimenté, l'injection intratrachéale présente cepen-

dant certaines difficultés dans la pratique courante, surtout chez les enfants. Le lipiodol a donné lieu à quantité d'applications pratiques et à des recherches expérimentales intéressantes. H. Roger, L. Binet et Verne ont étudié la lipodiérèse, la digestion intrapulmonaire des graisses au moyen des ferments qui n'agissent qu'en présence de l'oxygène de l'air. Sicard, Fabre et Forestier confirment ces données et font remarquer que l'iode du lipiodol est plus rapidement dissocié dans le poumon que dans les méninges.

L'inhalation de liquides pulvérisés en fines gouttelettes est un procédé thérapeutique très répandu. Jusqu'ici, on s'en est surtout servi pour le traitement d'affections locales de la cavité buccale et de l'appareil respiratoire, tandis que, à ma connaissance, son application dans le but de faire pénétrer des substances actives dans l'organisme par la voie pulmonaire n'est pas encore d'usage courant. Les avantages de l'inhalation sont cependant multiples.

Dans une revue très intéressante sur la thérapie par inhalation, Wieland distingue d'une part les gaz et les vapeurs monophasiques formés de molécules isolées (ammoniaque, anhydride sulfureux, chloroforme), d'autre part des gouttelettes et des fumées en suspension nébuleuse dans l'air et, de ce fait, diphasiques. La concentration de la suspension liquide ou solide est limitée afin que l'échange des gaz dans les alvéoles ne soit pas entravé. Une suspension de 20 millimètres cubes de liquide par litre d'air correspond pour l'homme adulte à une inhalation de 0 c.c. 16 par minute; la dose augmente avec la durée de l'inhalation.

D'après Rohrer, la surface du corps de l'adulte mesure 3.500 cent. carrés, la surface du parenchyme pulmonaire 900.000 cent. carrés environ, soit 250 fois plus. L'air inspiré atteint au passage du larynx une température de 30° avec 75 p. 100 de vapeur d'eau; dans les bronches et dans les poumons, l'air à 37° est saturé d'humidité. Tandis que les grosses gouttelettes se déposent déjà dans les narines, le pharynx et la trachée, les gouttelettes très fines en suspension dans l'air des poumons atteignent les alvéoles grâce à l'élévation de la température et à la saturation de la vapeur d'eau.

La répartition des liquides injectés dans la trachée ou inhalés

s'effectue sur une très grande surface. Le passage de l'antigène ou de toute autre substance à travers les cellules des alvéoles pulmonaires a lieu très rapidement, de sorte que nous pouvons admettre que l'absorption et le transport par la voie sanguine s'effectuent sans difficulté. Il est probable que cette absorption et la répartition dans l'organisme sont beaucoup plus uniformes et plus rapides que par injection sous-cutanée ou même intra-veineuse. La grande surface du parenchyme pulmonaire favorise l'absorption tandis qu'une instillation dans la conjonctive, les narines ou même dans la cavité buccale, est très limitée et, de ce fait, moins efficace.

D'après W. Heubner, qui a consacré d'importants travaux à l'étude de l'inhalation, le pouvoir de pénétration et l'absorption de gouttelettes et de poussières dépend du diamètre de ces particules ; la pénétration jusqu'aux alvéoles pulmonaires n'est possible que pour des gouttelettes de 0 millim. 002, soit 2μ , et au-dessous.

Nous ne parlerons pas des nombreux essais d'infection par inhalation ; qu'il nous suffise de rappeler les expériences de Flügge et de son école, de Behring, Calmette, Chaussé, etc., exécutées dans le but de déterminer le rôle de l'infection par inhalation, et de l'infection par ingestion dans la tuberculose. Nous savons aujourd'hui que l'infection par inhalation réussit avec des doses beaucoup plus faibles que l'infection par voie buccale.

La question qui nous occupera dans ce travail, l'immunisation par inhalation, n'a pas encore donné lieu à de nombreuses recherches de laboratoire. Citons les expériences de Kapralik et de von Schrötter sur la tuberculine. Brunzema a fait quelques essais d'immunisation contre le pneumocoque ; il n'a réussi qu'exceptionnellement à immuniser les souris par des inhalations répétées de cultures projetées sous forme de fines gouttelettes. Ch. Nicolle a immunisé contre la peste, Besredka contre le pneumocoque en se servant de la voie intratrachéale.

A. Trillat a communiqué le résultat de quelques essais de vaccination par inhalation contre le choléra des poules. Il a placé les souris en expérience dans un récipient en verre d'une contenance de 40 litres et leur a fait respirer une culture de choléra des poules en gouttelettes très fines. 10 à 15 p. 100 des

souris ont présenté une immunité contre le bacille virulent. L'auteur a amélioré ses résultats jusqu'au 60 à 80 p. 100 en répétant les inhalations et en prolongeant la durée d'exposition.

Avant d'entreprendre mes expériences, j'ai cherché à me procurer un appareil assurant la projection de gouttelettes très fines, les appareils généralement en usage ne répondant pas à cette condition primordiale. L'année dernière, j'ai trouvé à Paris un nébuleur (Nébuleur Diastello, Maison Vaast, place de l'Odéon, Paris) qui m'a donné satisfaction.

Ce petit appareil, tout en verre, permet la projection de très fines gouttelettes au moyen d'un ballon de caoutchouc. Grâce à la précieuse collaboration de M. le professeur Scherrer, professeur de physique à l'Ecole polytechnique fédérale à Zurich, et de son assistant, j'ai réussi à améliorer l'appareil et à le relier à une pompe à eau sous pression. De cette façon, la manipulation a été simplifiée et la pulvérisation plus régulière.

Les expériences que nous allons relater ont toutes été effectuées avec le même appareil. Les animaux — cobayes et souris blanches — étaient placés dans une caisse vitrée avec cadre et fond métallique. Une vitre percée permettait de placer le nébuleur de façon à répartir les gouttelettes uniformément à l'intérieur de la boîte. La boîte de verre mesure 40 centimètres sur chaque côté; elle a une contenance de 64 litres. J'ai fait placer à son tiers inférieur une plaque de tôle légèrement inclinée avec un orifice central pour l'écoulement de l'urine et deux plaques de tôle verticales dans le but d'éviter autant que possible les angles morts. De cette façon, la distribution des gouttelettes à l'intérieur était plus uniforme.

Les cobayes pouvaient se mouvoir librement dans l'intérieur de la boîte; un treillis placé près de l'embouchure du pulvérisateur devait empêcher l'absorption directe des gouttelettes par la voie buccale. Ce procédé d'inhalation est bien simple; il est passible de perfectionnements surtout en vue d'obtenir un meilleur rendement de l'inhalation.

La durée d'exposition varia entre deux et quatre heures, elle a été en moyenne de trois heures. Nous avons souvent exposé les mêmes animaux le matin et l'après-midi; entre temps nous les gardions à l'écurie.

L'Institut Pasteur de Paris m'a fourni très obligeamment la toxine, l'anatoxine et l'antitoxine diphtérique et tétanique qui ont servi à mes expériences; je tiens à lui en exprimer toute ma reconnaissance. J'adresse aussi mes sincères remerciements à M. le Dr Ramon, qui a bien voulu se charger de m'approvisionner à maintes reprises et qui a toujours été d'une grande prévenance à mon égard.

Nous indiquons dans nos tableaux la quantité de liquide pulvérisé en gouttelettes, mais il ne nous est pas possible de déterminer la quantité de liquide aspiré par chaque animal d'expérience. L'effet des inhalations est fonction de la concentration des gouttelettes et de la durée de l'inhalation, probablement aussi de la température et du degré hygrométrique de l'air ambiant.

Les cobayes et les souris ont bien supporté l'inhalation. Nous n'avons eu que peu de décès à enregistrer. Nous avons contrôlé le poids de nos animaux afin d'éliminer ceux qui diminuaient de poids au cours des inhalations, quitte à les réintégrer plus tard.

Au cours de nos expériences nous avons varié les quantités de liquide pulvérisé, le nombre des séances, l'intervalle entre la première inhalation et l'injection d'épreuve et les doses de toxine à injecter.

Les expériences ont été effectuées durant les mois de juin à novembre 1933 dans un laboratoire de l'Institut d'Hygiène. Il est possible que les gouttelettes se maintiennent plus ou moins longtemps dans l'air suivant la température du milieu ambiant et aussi suivant la durée des pulvérisations. Pendant la saison froide le laboratoire a été chauffé; il m'a paru que les gouttelettes se condensent plus rapidement en hiver qu'en été.

1. EXPÉRIENCES SUR LA DIPHTÉRIE.

Pour l'immunisation des cobayes je me suis servi exclusivement d'anatoxine diphtérique, titrant 26 unités Ramon.

Il n'est pas possible de déterminer d'une façon même approximative la quantité de liquide inhalé. Au début, nous projections 1 c. c. 5 à 3 c. c. 5, plus tard, la dose a été augmentée jusqu'à 7 c. c. 5 et 9 cent. cubes par demi-journée et par

séance. Les animaux d'expérience, dont le nombre a varié entre 4 et 12, étaient placés dans la boîte de verre. Les cobayes soumis à l'inhalation pesaient 250 à 300 grammes au début; la plupart ont augmenté de poids, de sorte que, lors de l'épreuve, quelques animaux pesaient jusqu'à 350 à 370 grammes. Je vais résumer nos expériences :

PREMIÈRE SÉRIE. — Au début, l'anatoxine a été projetée au moyen d'un ballon de caoutchouc à raison de 0 c. c. 2 à 0 c. c. 8 d'anatoxine par dix minutes. L'intervalle entre deux pulvérisations variait entre vingt et cinquante minutes. Pour les dernières inhalations, je me suis servi de la pompe à eau; ce perfectionnement permet une projection plus constante et plus rapide.

Les premiers cobayes ont été exposés à 14 inhalations du 15 juin au 4 juillet, presque tous les jours sauf les dimanches. L'injection d'épreuve a eu lieu le 17 juillet, soit trente-deux jours après la première inhalation. Afin de déterminer le degré d'immunité, nous avons injecté des doses de toxine diphtérique variant entre $1/10.000$ et $1/20$ de centimètre cube, la dose mortelle minima étant un peu au-dessus de $1/10.000$. Les 2 cobayes, le témoin et l'animal soumis aux inhalations, qui ont reçu une injection intracutanée de $1/10.000$, ont résisté, le témoin avec une escarre; les autres témoins sont morts : avec $1/1.000$ le cinquième jour, avec $5/1.000$ dans la nuit du premier au deuxième jour et avec $1/20$ de centimètre cube de toxine en moins de vingt heures. Tous les animaux traités par les inhalations ont présenté une résistance manifeste. L'animal traité qui a reçu $1/20$ de toxine survit vingt-six jours, celui qui a été éprouvé avec $5/1.000$ survit définitivement et le cobaye éprouvé avec $1/1.000$ meurt le onzième jour. 2 cobayes qui avaient résisté à la dose mortelle pour le témoin sont morts après trois semaines; leur décès est probablement dû à une vaste escarre qui s'était développée au point d'injection de la toxine.

DEUXIÈME SÉRIE. — Les pulvérisations ont eu lieu du 13 juillet au 4 août, la quantité d'anatoxine projetée au moyen de la pompe à eau varia entre 3 cent. cubes et 5 c. c. 5 à raison de trois projections par séance à intervalles d'une heure environ. L'injection d'épreuve a eu lieu le 15 août. Les animaux de cette série ont inhalé onze, six et cinq fois, la quantité de liquide projetée a varié entre 13 c. c. 5 et 41 cent. cubes. L'intervalle entre la première inhalation et l'injection d'épreuve a été de vingt à cinquante jours. L'injection d'épreuve de $1/10$ de centimètre cube de toxine, soit une dose de plus de cent fois mortelle, a tué l'animal témoin en vingt heures, tandis que les cobayes à 6 et à 11 inhalations sont morts avec un retard de dix et de vingt-quatre heures. Le témoin à $1/50$ de centimètre cube de toxine meurt également en moins de vingt heures, tandis que des 3 cobayes traités deux résistent définitivement; le troisième, qui a inhalé l'anatoxine au mois de juin, meurt dans la nuit du treizième jour avec une grande escarre. Avec $1/200$ de centimètre cube, le cobaye témoin meurt en quarante-cinq heures, un deuxième avec 3 inhalations en cinquante-quatre heures, tandis qu'un troisième cobaye, qui a inhalé six fois, survit vingt et un jours et meurt d'un abcès qui s'est développé accidentellement à la nuque. Nous avons injecté le 19 août une émulsion de culture de bacilles virulents. Les 2 cobayes témoins sont morts en

moins de quarante-cinq heures, 1 cobaye soumis à une seule inhalation meurt en même temps, tandis que 2 cobayes qui ont inhalé cinq à six fois ont survécu.

J'ai inoculé en même temps 2 cobayes qui avaient reçu une injection sous-cutanée de 0 c. 5 et de 1 cent. cube d'anatoxine six jours avant l'épreuve ; les 2 animaux sont morts en même temps que les témoins, comme il fallait s'y attendre, l'immunisation ne se produisant pas si vite. Un troisième cobaye, injecté en même temps que les deux précédents, et éprouvé après quarante-sept jours, survit.

TABEAU 1 a. — Injection préventive d'anatoxine diphtérique.

NUMÉRO du cobaye	INJECTION sous-cutanée d'anatoxine en cent. cube le 15 août	INTERVALLE en jours	INJECTION d'épreuve en cent. cube de toxine	RÉSULTAT
471	1,0	6	1/200	+ 45 h.
469	0,5	6	1/200	+ en moins de 20 h.
472	0,5	47	1/200	Survit.

TROISIÈME SÉRIE. — Dans cette série nous avons éprouvé des animaux qui ont inhalé du 13 au 24 juillet et d'autres du 5 au 16 septembre. L'injection d'épreuve a eu lieu le 25 septembre. L'intervalle entre les premières inhalations et l'injection varia entre seize et soixante-quatorze jours. Les résultats peuvent se résumer comme suit :

Les témoins avec 1/100 et 1/400 de centimètre cube de toxine meurent dans l'espace de vingt-huit à quarante-cinq heures, les 3 cobayes préparés avec 6 à 11 inhalations avec une quantité totale variant entre vingt et un et 80 cent. cubes d'anatoxine ont survécu. L'un est mort après vingt-six jours d'une maladie intercurrente. Sur 3 animaux soumis à l'injection de 1/100 de centimètre cube de toxine l'un est mort de pneumonie, l'autre le seizième jour sans symptômes de diphtérie, tandis que le troisième a survécu. Sur 4 cobayes éprouvés avec une émulsion de culture virulente l'un avec 11 inhalations a survécu, un deuxième avec 7 inhalations est mort en vingt et un jours avec une large escarre accompagnée d'ulcération, les 2 autres avec 3 et 5 inhalations sont morts dix à vingt-quatre heures après le témoin. L'immunité est spécifique ; 2 cobayes qui avaient été immunisés et éprouvés contre la toxine tétanique sont morts en même temps que les témoins après une injection de toxine diphtérique.

Les trois séries d'expériences résumées ci-dessus ont fourni un résultat nettement positif. Il est possible d'immuniser des cobayes au moyen d'inhalations d'anatoxine diphtérique. La dose et le nombre des inhalations paraissent jouer un certain rôle. Une seule inhalation n'a pas suffi, un autre cobaye avec trois inhalations est mort quelques heures après le témoin, tandis que tous les animaux qui ont été exposés à un

TABLEAU I. — Immunisation par inhalation d'anatoxine diphtérique.

NUMÉRO du cobaye	INHALATION	NOMBRE d'inhalations	LIQUIDE projeté (1) en cent. cubes	INTERVALLE (2) en jours	INJECTION D'ÉPREUVE	RÉSULTAT
473	Du 15 juin au 4 juillet.	14	29	31	17 juillet.	Survit.
372	Témoin.	—	—	—	5/10.000 cent. cube de toxine.	Survit.
475	Du 15 juin au 4 juillet.	44	29	32	1/1.000 cent. cube de toxine.	+ 40 j. (3).
373	Témoin.	—	—	—	5/1.000 cent. cube de toxine.	+ 5 j.
476	Du 15 juin au 4 juillet.	44	29	32	5/1.000 cent. cube de toxine.	Survit.
374	Témoin.	—	—	—	5/1.000 cent. cube de toxine.	+ 40 h.
477	Du 15 juin au 4 juillet.	44	29	32	5/100 cent. cube de toxine.	+ 26 j. (3).
394	Témoin.	—	—	»	5/400 cent. cube de toxine.	+ 19 h.
350	Du 13 juillet au 4 août.	41	41	33	15 août.	
354	Du 13 juillet au 24 août.	6	24	33	1/40 cent. cube de toxine.	+ 45 h.
522	Témoin.	—	—	—	1/10 cent. cube de toxine.	+ 30 h.
250	Du 26 juillet au 4 août.	5	43,5	50	45/0 cent. cube de toxine.	+ 20 h.
351	Du 13 juillet au 4 août.	41	41	33	1/50 cent. cube de toxine.	+ 14 j. (3).
448	Du 26 juillet au 4 août.	5	24	26	4/50 cent. cube de toxine.	Survit.
521	Témoin.	—	—	—	1/50 cent. cube de toxine.	+ 20 h.
280	4 juillet.	1	3,2	45	19 août.	
356	Du 13 juillet au 24 juillet.	6	21	36	Culture de bacilles diphtériques.	+ 30 à 40 h.
420	Du 26 juillet au 4 août.	5	21	24	Culture de bacilles diphtériques.	Survit.
539	Témoin.	—	—	—	Culture de bacilles diphtériques.	Survit.
540		—	—	—	Culture de bacilles diphtériques.	+ 30 à 40 h.
357	Du 13 juillet au 24 juillet.	6	21	74	25 août.	
670	Du 5 septembre au 16 septembre.	41	82	20	1/400 cent. cube de toxine.	+ 26 j. (3).
677	Du 9 septembre au 16 septembre.	7	52	46	1/400 cent. cube de toxine.	Survit.
789	Témoin.	—	—	—	1/400 cent. cube de toxine.	Survit.

	Témoin.					1/200 cent. cube de toxine. \pm 45 h. environ.
669	Du 5 septembre au 16 septembre.	41	82	20	1/100 cent. cube de toxine. \pm 16 j. (4).	
678	Du 9 septembre au 16 septembre.	7	52	46	1/100 cent. cube de toxine. Survit.	
353	Du 13 juillet au 24 juillet.	6	21	74	1/100 cent. cube de toxine. \pm 28 h. (4).	
794	Témoin.	—	—	—	1/100 cent. cube de toxine. \pm 28 h.	
424	Du 28 juillet au 4 août.	5	24	60	Culture de bacilles diphtériques. \pm 56 à 70 h.	
661	Du 3 septembre au 7 septembre.	3	22	20	Culture de bacilles diphtériques. \pm 50 h.	
668	Du 5 septembre au 16 septembre.	41	52,5	20	Culture de bacilles diphtériques. Survit.	
679	Du 5 septembre au 16 septembre.	7	52,5	46	Culture de bacilles diphtériques. \pm 21 j. (3).	
792	Témoin.	—	—	—	Culture de bacilles diphtériques. \pm 30 à 45 h.	
663	Du 5 septembre au 8 septembre	9	67,5	64	1/50 cent. cube de toxine. Survit.	
995	et du 31 octobre au 4 novembre.	3	54	8	1/30 cent. cube de toxine. \pm 23 h.	
666	Du 31 octobre au 4 novembre.	12	424,5	64	1/30 cent. cube de toxine. Survit.	
454	Du 5 juillet au 12 juillet.	—	—	—	1/50 cent. cube de toxine. \pm en moins de 20 h.	
	Témoin.	—	—	—		
665	Du 3 juillet au 12 juillet.	7	52,5	64	1/500 cent. cube de toxine. Survit.	
662	Du 5 juillet au 7 juillet.	3	22,5	64	1/500 cent. cube de toxine. \pm 40 h., pneumonie.	
713	Du 14 juillet au 16 juillet	8	95	64	1/500 cent. cube de toxine. Survit.	
994	et du 31 octobre au 4 novembre.	—	—	—		
680	Du 31 octobre au 4 novembre.	5	54	8	1/500 cent. cube de toxine. \pm 20 h.	
455	Du 9 octobre au 16 octobre.	7	52,5	59	1/500 cent. cube de toxine. Survit.	
	Témoin.	—	—	—	1/500 cent. cube de toxine. \pm 70 h.	

- (1) Quantité totale d'anatoxine pulvérisée en centimètres cubes.
 (2) Intervalle entre la première inhalation et l'injection d'épreuve.
 (3) Grande escarre.
 (4) Pas de lésions diphtériques.
 (5) Abscès à la nuque.

plus grand nombre d'inhalations ont résisté. Les animaux ont supporté de fortes doses de toxine. Avec une dose d'épreuve de 1/10 de centimètre cube, soit plus de cent fois la dose mortelle, les animaux traités ont succombé, mais, même avec ces fortes doses, nous avons pu constater un retard sur les témoins non traités. Les cobayes sont restés en observation trente jours après l'injection d'épreuve. Parmi les animaux morts de dix à vingt jours et davantage après l'épreuve, les uns ont succombé à une large escarre partant du point d'inoculation de la toxine, les autres sont morts d'abcès ou d'une autre affection intercurrente de nature non diphtérique.

2. IMMUNISATION CONTRE LE TÉTANOS.

Les inhalations ont été effectuées dans le même appareil et dans les mêmes conditions. Nous avons exposé des cobayes et des souris aux inhalations d'anatoxine tétanique non diluée.

PREMIÈRE SÉRIE. — Les inhalations ont duré du 17 au 28 août. Le nombre des inhalations varia entre 3 et 7 et la quantité d'anatoxine pulvérisée entre 10 et 25 cent. cubes. L'intervalle entre le début des inhalations et l'injection d'épreuve n'était que de treize jours. Avec 1/100 de cent. cube de toxine, le témoin meurt dans l'espace de vingt-cinq heures, le cobaye soumis à 7 inhalations survit. Avec 1/500 de centimètre cube, le témoin meurt en moins de quarante-deux heures, un cobaye à 3 inhalations meurt en même temps, tandis qu'un autre cobaye à 7 inhalations meurt au bout de trois jours. Avec une émulsion de culture tétanique, le témoin meurt en vingt-sept heures, le cobaye qui a inhalé sept fois présente un tétanos à partir du deuxième jour, mais ne meurt que le seizième jour, soit avec une survie de quinze jours.

Dans une DEUXIÈME SÉRIE d'expériences nous avons augmenté le nombre des inhalations et la quantité d'anatoxine projetée. Un cobaye témoin meurt en moins de quarante heures avec 1/50 de toxine, 3 cobayes à 6, 10 et 12 inhalations survivent. 3 autres cobayes sont éprouvés avec 1/500 de toxine tétanique; le témoin meurt dans l'espace de soixante heures, un cobaye avec 10 inhalations meurt avant le témoin (cause inconnue), tandis que les deux autres, qui ont reçu 6 et 7 inhalations, survivent sans symptômes. Le témoin qui a reçu une émulsion de culture meurt en deux jours et demi, 2 cobayes à 6 inhalations meurent à peu près en même temps, tandis que les 2 autres qui ont inhalé sept et douze fois survivent définitivement.

Les expériences sur les souris ont été moins concluantes. Dans la première série les deux souris qui ont reçu 1/100 de centimètre cube de toxine sont mortes en même temps que le

témoin, celles avec 1/500 ont présenté une survie de deux à trois jours. Sur 3 souris exposées à 7 inhalations, 2 sont mortes avant le témoin, et une a survécu un jour.

TABLEAU III. — Immunisation
par inhalation d'antitoxine diphtérique.

NUMÉRO DU COBAYE	INHALATIONS (1)		SÉRUM PROJETÉ (2) en cent. cubes	INJECTION D'ÉPREUVE	RÉSULTAT
	Avant	Après			
768	3	—	24	25 septembre. 1/400 cent. cube de toxine.	Survit.
785	—	3	45	1/400 cent. cube de toxine.	Survit.
786	—	3	45	1/400 cent. cube de toxine.	+ 15 j. (3).
789	Témoin.		—	1/400 cent. cube de toxine.	+ 26 h.
790	Témoin.		—	1/400 cent. cube de toxine.	+ 42 h.
770	3	3	69	1/100 cent. cube de toxine.	Survit (3).
791	Témoin.		—	"	+ 28 h.
769	3	3	24	Culture de bacilles diphtériques.	Survit.
771	1	3	51	Culture de bacilles diphtériques.	Survit.
787	—	3	45	Culture de bacilles diphtériques.	+ 9 j.
788	—	3	45	Culture de bacilles diphtériques.	Survit.
792	Témoin.		—	Culture de bacilles diphtériques.	+ 40 h. environ.
434	3	4	82	8 novembre. 1/50 cent. cube de toxine.	Survit.
454	Témoin.		—	1/50 cent. cube de toxine.	+ 20 h.
433	3	—	32	1/500 cent. cube de toxine.	Survit.
458	—	4	61	1/500 cent. cube de toxine.	+ 6 j. 1, 2.
435	Témoin.		—	1/500 cent. cube de toxine.	+ 70 h.

(1) Nombre d'inhalations de sérum antitoxique avant et après l'injection d'épreuve.
 (2) Quantité totale de sérum projeté en centimètres cubes.
 (3) Grande éscarre.

Il est possible que les souris placées très près du fond de la boîte n'aient pas inhalé, toutes proportions gardées, autant d'anatoxine que les cobayes. Nous devons enregistrer quelques insuccès chez les cobayes provenant peut-être de l'imperfection de notre technique, peut-être aussi de différences de réactions individuelles.

Bien que les inhalations d'anatoxine tétanique ne nous

aient pas fourni un résultat aussi net que les précédentes avec l'anatoxine diphtérique, nous pouvons cependant conclure que,

TABLEAU IV. — Immunisation par inhalation d'antitoxine tétanique.

NUMÉRO DU COBAYE	INHALATIONS (1)		SÉRUM PROJETÉ (2) en cent. cubes	INJECTION D'ÉPREUVE	RÉSULTAT
	Avant	Après			
606	1	2	28	30 août. 1/100 cent. cube de toxine.	† 48 h.
592	3	2	34	1/100 cent. cube de toxine.	Survit (3).
612	Témoin.		—	1/100 cent. cube de toxine.	† 25 h.
591	4	2	48	1/500 cent. cube de toxine.	Survit (3).
605	3	2	40	1/500 cent. cube de toxine.	Survit (3).
615	—	3	30	1/500 cent. cube de toxine.	† 64 h. environ.
616	—	3	30	1/500 cent. cube de toxine.	† 64 h. environ.
614	Témoin.		—	1/500 cent. cube de toxine.	† 40 h. environ.
594	3	2	45	Culture de bacilles tétaniques.	Survit (3).
595	4	3	60	Culture de bacilles tétaniques.	Survit (3).
618	—	2	20	Culture de bacilles tétaniques.	† 40 h. environ.
619	—	2	20	Culture de bacilles tétaniques.	† 40 h. environ.
617	Témoin.		—	Culture de bacilles tétaniques.	† 28 h.
822	1	—	8	16 octobre. 1/50 cent. cube de toxine.	† 40 h.
901	1	2	16	1/50 cent. cube de toxine.	† 40 h.
903	—	2	17	1/50 cent. cube de toxine.	† 40 h.
907	Témoin.		—	1/50 cent. cube de toxine.	† 40 h.
823	5 (4)	—	28	1/500 cent. cube de toxine.	† 55 h.
904	—	4	37	1/500 cent. cube de toxine.	† 64 h. environ.
908	Témoin.		—	1/500 cent. cube de toxine.	† 64 h. environ.
824	3 (4)	3	72	Culture de bacilles tétaniques.	† 72 h.
902	1	5	54	Culture de bacilles tétaniques.	† 5° j.
909	Témoin.		—	Culture de bacilles tétaniques.	† 55 h. environ.

(1) Nombre d'inhalations avant et après l'injection d'épreuve.
 (2) Quantité totale de sérum projeté en centimètres cubes.
 (3) Symptômes de tétanos grave.
 (4) 30 septembre, 2 octobre, 3 octobre, 4 octobre, 16 octobre. Les inhalations d'antitoxine ont été espacées.

dans la majorité des cas, il a été possible d'immuniser le cobaye contre une dose considérable de toxine ou de culture tétanique. D'après nos expériences, l'immunité vis-à-vis de la

culture est plus difficile à obtenir que vis-à-vis de la toxine tétanique.

TABEAU IV a. — Inhalation d'antitoxine tétanique chez la souris.

INHALATIONS (1)		INJECTION d'épreuve en cent. cube de toxine	RÉSULTAT
Avant	Après		
3	—	1/100	+ 4 j. 1/2.
3	—	1/100	+ 5 j.
Témoin.		1/100	+ 24 h.
3	—	1/500	+ 4 j.
3	—	1/500	+ 8 j. (2).
2	3	1/500	+ 4 j.
2	3	1/500	+ 4 j.
2	5	1/500	+ 27 j. (2).
Témoin.		1/500	+ 4 j.
Témoin.		1/500	+ 3 j. 1/2.

(1) Nombre d'inhalations avant et après l'injection d'épreuve.
(2) Tétanos grave.

En diminuant l'intervalle entre l'inhalation et l'injection d'épreuve, nous avons pu constater que l'immunité est déjà très nette treize et même onze jours après la première inhalation d'anatoxine. D'après ces résultats, l'immunité s'obtient plus rapidement par inhalation que par injection sous-cutanée. Des expériences comparatives sont nécessaires pour élucider définitivement ce point important.

3. IMMUNISATION PAR L'ANTITOXINE DIPHTÉRIQUE.

Nous avons essayé d'immuniser des cobayes avant l'injection d'épreuve (inhalation prophylactique), et, d'autre part, nous avons inoculé la toxine avant l'inhalation d'antitoxine (inhalation thérapeutique).

PREMIÈRE SÉRIE (25 septembre). — Les inhalations prophylactiques ont eu lieu les 22, 23 et 25 septembre, les inhalations thérapeutiques le 25 septembre, une demi-heure après l'injection de toxine, le 26 et le 27 septembre.

Avec 1/400 de centimètre cube de toxine, 2 témoins meurent en vingt-cinq et en moins de quarante-deux heures, un cobaye avec 3 inhalations prophy-

lactiques (24 cent. cubes de sérum) survit, 3 autres cobayes qui ont été exposés à 3 inhalations après l'inoculation de toxine survivent; l'un meurt après quinze jours avec un ulcère au point d'inoculation, les 2 autres survivent définitivement. Le cobaye témoin qui reçoit 1/100 de centimètre cube de toxine meurt en vingt-huit heures, le cobaye exposé à 3 inhalations avant et à 3 inhalations après l'injection survit avec une grande escarre. Avec la culture de bacilles virulents, le témoin meurt en moins de quarante-deux heures, un cobaye avec 3 inhalations prophylactiques et un autre cobaye avec une inhalation avant et 3 après l'injection d'épreuve survivent; 2 autres cobayes soumis aux inhalations après l'injection de culture survivent, l'un neuf jours et l'autre définitivement en présentant une escarre.

DEUXIÈME SÉRIE (8 novembre). — Le témoin qui reçoit 1/50 de centimètre cube de toxine meurt en vingt heures; un cobaye soumis à 3 inhalations avant et à 4 inhalations après l'injection d'épreuve survit. Le témoin avec 1/500 de toxine meurt en soixante-dix heures, le cobaye soumis à 3 inhalations avant l'injection survit, un autre cobaye qui a inhalé quatre fois après l'injection meurt dans la nuit du sixième jour, soit quatre jours après le témoin.

Ces expériences, répétées en deux séries, ont fourni un résultat nettement positif. Il est possible d'immuniser le cobaye contre une dose dix à vingt fois mortelle de toxine diphtérique et contre le bacille virulent. Il est également possible de sauver les cobayes au moyen d'inhalations thérapeutiques d'antitoxine administrées après l'injection d'épreuve à condition de n'attendre pas trop longtemps et de faire inhaler des doses suffisantes.

4. ANTITOXINE TÉTANIQUE.

PREMIÈRE SÉRIE. — Avec 1/100 de centimètre cube de toxine, le cobaye témoin meurt en vingt-cinq heures, un cobaye qui a inhalé une fois avant et deux fois après l'injection meurt vingt-trois heures plus tard, tandis que le cobaye qui a été exposé aux inhalations trois fois avant et deux fois après l'injection survit, tout en présentant pendant plusieurs jours des symptômes de tétanos très grave. Avec 1/500 de toxine, le cobaye témoin meurt en moins de quarante-cinq heures, 2 cobayes traités avec 3 et 4 inhalations avant et 2 inhalations après l'injection survivent, présentant tous deux pendant longtemps des symptômes de tétanos. 2 autres cobayes qui ont inhalé trois fois meurent de tétanos vingt-quatre heures après le témoin. Avec la culture tétanique, le témoin meurt en vingt-huit heures, 2 cobayes qui ont inhalé trois et quatre fois avant et deux et trois fois après survivent avec des symptômes de tétanos très grave, tandis que les 2 cobayes qui ont inhalé après l'inoculation (inhalations thérapeutiques) meurent environ quinze heures après le témoin.

DEUXIÈME SÉRIE (18 octobre). — Dans cette série, les résultats ont été moins nets parce que nous avons diminué le nombre des inhalations. 1 cobaye avec 1 inhalation prophylactique, 1 autre cobaye avec 2 inhalations prophy-

lactiques et un troisième cobaye exposé avant et après l'inoculation d'épreuve de 1/50 de centimètre cube de toxine tétanique sont tous morts en quarante heures.

Avec 1/500 de centimètre cube de toxine, les résultats n'ont pas été satisfaisants, seuls 2 cobayes éprouvés avec une culture tétanique ont présenté une survie de dix-huit heures et de trois jours sur le témoin.

EXPÉRIENCES SUR LA SOURIS. — 2 souris qui ont inhalé trois fois avant l'injection de 1/100 de centimètre cube de toxine ont présenté une survie de deux jours et demi et de trois jours sur les témoins. La souris témoin qui a reçu 1/500 de centimètre cube de toxine meurt le cinquième jour, une souris avec 2 inhalations avant et 3 inhalations après l'injection survit jusqu'au vingt-huitième jour avec un tétanos très grave. Avec la culture de bacilles tétaniques, la souris témoin meurt en vingt-huit heures, 2 souris qui ont inhalé une fois avant et trois fois après l'inoculation, survivent quatorze et vingt-huit heures.

Comme pour l'anatoxine, les expériences que nous avons effectuées avec l'antitoxine tétanique ne nous ont pas fourni de résultats aussi nettement positifs que pour la diphtérie. Nous pouvons néanmoins conclure que nous avons réussi à immuniser contre le tétanos au moyen d'inhalations d'antitoxine. Nos expériences ont été très intéressantes en ce sens que nous avons pu observer l'action thérapeutique de l'antitoxine antitétanique. Quelques-uns de nos animaux ont présenté des symptômes tétaniques qui ont diminué grâce à la répétition des inhalations d'antitoxine. Nous avons eu l'occasion d'observer des cobayes et des souris tétaniques pendant plus de quinze jours qui se sont remis petit à petit, fait qui ne s'est jamais présenté chez les animaux témoins.

J'ajoute à cette description quatre tableaux résumant toutes mes expériences. Il s'agit, bien entendu, d'expériences préliminaires; les résultats obtenus me paraissent encourageants. La question de l'immunisation par inhalation n'a pas seulement un intérêt théorique; dans bien des cas, on pourra avoir recours à ce procédé dans un but prophylactique ou thérapeutique. Je crois que nous pouvons dès maintenant recommander les inhalations d'antitoxine dans des cas graves de tétanos et de diphtérie. Il reste encore mainte question à élucider; nous ne savons pas encore si l'inhalation d'anatoxine est capable de procurer une immunité durable. La question de l'anaphylaxie sérique par la voie pulmonaire fera l'objet de recherches ultérieures.

CONCLUSIONS.

1° Il est possible d'immuniser au moyen d'inhalations répétées d'anatoxine Ramon contre la toxine diphtérique, contre la toxine tétanique et contre les cultures virulentes de bacilles diphtériques et de bacilles tétaniques.

2° L'immunité obtenue par inhalation d'anatoxine s'établit assez rapidement et a déjà été manifeste onze à treize jours après la première inhalation pour le tétanos et au bout de seize jours pour la diphtérie. Les animaux éprouvés avant cet intervalle n'ont pas résisté.

3° Pour obtenir une immunité contre une dose sûrement mortelle, il est indispensable, d'après nos expériences, de faire inhaler à plusieurs reprises l'anatoxine diphtérique ou tétanique. Ces inhalations répétées ont été bien tolérées par les animaux. Le degré d'immunité dépend du nombre des inhalations et de la quantité d'antigène inhalé.

La durée de l'immunité par inhalations répétées a été jusqu'ici de deux mois au moins pour la diphtérie.

4° Nous avons également réussi à immuniser nos animaux d'expériences au moyen d'inhalations de sérum antitoxique. Les résultats les plus favorables ont été obtenus par inhalations prophylactiques répétées, effectuées avant l'injection d'épreuve. L'immunité est d'autant plus nette que l'inhalation d'antitoxine est plus rapprochée de l'injection d'épreuve. L'application thérapeutique de l'antitoxine, c'est-à-dire l'inhalation effectuée après l'injection de toxine ou de culture virulente, nous a fourni des résultats encourageants. Il est indispensable de commencer l'inhalation très peu de temps après l'injection d'épreuve. Les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque les animaux sont soumis aux inhalations d'antitoxine avant et après l'injection d'épreuve.

Des recherches ultérieures nous renseigneront sur la possibilité d'immuniser contre d'autres microbes pathogènes et d'appliquer cette méthode à la chimiothérapie.

Nous pouvons espérer dès maintenant que l'inhalation sera appelée à jouer un rôle utile dans la prophylaxie et dans la thérapie.

BIBLIOGRAPHIE

- BESREDKA. *Bull. Inst. Pasteur*, 1920, p. 125; *Immunité*, 1927, p. 306.
BRUNZEMA. *Z. f. Hygiene*, **112**, p. 708.
BUSSON. *Wiener Klin. Woch.*, 1911, p. 1492.
BUSSON et OGATA. *Wiener Klin. Woch.*, 1924, p. 820.
CALMETTE, BOQUET et NÈGRE. *Ces Annales*, **38**, p. 399.
CHAUSSÉ. *Ces Annales*, **30**, p. 613.
HEUBNER. *Klin. Woch.*, 1924, p. 2342, *id.*, 1925, p. 2099; *D. M. W.*, 1926, p. 1508.
KAPRALIK et VON SCHRÖTTER. *Kolle, Uhlenhuth*, vol. 5, p. 253.
LANGE (Br.). *Z. f. Hygiene*, **103**, p. 1.
LAQUEUR et GREVENSTUK. *Klin. Woch.*, 1924, p. 1273.
MAIGNON. *C. R. Soc. Biol.*, 1922, p. 1472.
NEUFELD et ETTINGER. *Z. f. Hyg.*, **112**, p. 492, *id.*, **115**, p. 573.
NICOLLE. *C. R. Ac. Sc.*, 1931, p. 1593.
ROGER, BINET et VERNE. *C. R. Soc. Biol.*, 1925, vol. 88, p. 1140.
SEEMANN. *Ziegler's Beiträge*, 1923, vol. 74, p. 345.
SICARD, FABRE et FORESTIER. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, p. 564.
V. SKRAMLIK (E.). *Handb. der normalen u. patholog. Physiologie, Atmung*. Julius Springer, 1925.
TRILLAT. *C. R. Ac. Sc.*, 1932, p. 184 et 321.
WIELAND. *Z. f. Laryng.*, **16**, p. 23.

LES VACCINATIONS ANTIRABIKES

A L'INSTITUT PASTEUR EN 1933

par JULES VIALA.

Ce rapport, établi suivant le plan fixé par la Conférence internationale de la Rage, ne concerne que l'année 1933.

1° Personnes traitées :

443 personnes ont été admises à suivre le traitement antirabique.

2° Méthode de traitement :

Emulsions de moelles de lapins, desséchées de deux à cinq jours à 22° et conservées en glycérine neutre, dans un appareil frigorifique (+ 3°).

Les inoculations sont pratiquées journellement, pendant quinze, dix-huit, vingt et un ou vingt-cinq jours, suivant la gravité des cas.

Voici le schéma des injections antirabiques :

1 ^{er} jour	Moelle de 5 jours (3 cent. cubes).
2 ^e —	— 5 — —
3 ^e —	— 4 — —
4 ^e —	— 4 — —
5 ^e —	— 3 — —
6 ^e —	— 3 — —
7 ^e —	— 4 — —
8 ^e —	— 3 — —
9 ^e —	— 2 — —
10 ^e —	— 3 — —
11 ^e —	— 3 — —
12 ^e —	— 2 — —
13 ^e —	— 3 — —
14 ^e —	— 3 — —
15 ^e —	— 2 — —
16 ^e jour	Moelle de 4 jours (3 cent. cubes).
17 ^e —	— 3 — —
18 ^e —	— 2 — —
19 ^e jour	Moelle de 3 jours (3 cent. cubes).
20 ^e —	— 3 — —
21 ^e —	— 2 — —

22 ^e jour	Moelle de 3 jours (3 cent. cubes).
23 ^e —	— 3 — —
24 ^e —	— 2 — —
25 ^e —	— 2 — —

3° Répartition des personnes, d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :

France.	439
Allemagne.	1
Espagne.	1
Suisse.	2

4° D'après l'espèce de l'animal mordeur :

Chiens de propriétaires connus	183
Chiens errants.	153
Chats	92
Ruminants	3
Autres animaux	12

5° D'après les preuves de rage chez l'animal mordeur :

Catégorie A : Rage contrôlée expérimentalement (1)	41
Catégorie B : Rage diagnostiquée par examen vétérinaire. .	122
Catégorie C : Suspicion de rage.	280

6° D'après le caractère des morsures :

Profondes	370
Superficielles	73

7° Interposition des vêtements :

Sur la peau nue	326
A travers le vêtement	117

8° D'après le siège de la morsure (2) :

Tête.	36
Membres supérieurs.	324
Tronc	2
Membres inférieurs	81

(1) Les centres nerveux des animaux mordeurs sont aussi examinés au Laboratoire national des Recherches vétérinaires d'Alfort, et les résultats sont transmis à notre service.

(2) Pour les morsures multiples on indique uniquement le siège de la plus dangereuse.

9° *D'après le nombre de jours écoulés entre la morsure et le traitement :*

0 à 4 jours	224
5 à 7 jours	105
8 à 14 jours	91
15 à 21 jours	16
Plus de 21 jours	7

10° *Autres renseignements :*

Répartition par départements des 439 personnes traitées mordues en France.

Aisne	2	Lot	4
Allier	3	Maine-et-Loire	2
Alpes (Hautes-).	2	Manche	1
Ardennes	6	Marne	2
Aube	7	Meuse	3
Aveyron	2	Morbihan	7
Bouches-du-Rhône	1	Moselle	1
Calvados	3	Nièvre	2
Cantal	4	Nord	1
Cher	2	Oise	6
Corrèze	1	Pas-de-Calais	1
Corse	1	Puy-de-Dôme	17
Côtes-du-Nord	9	Saône (Haute-).	1
Creuse	1	Sarthe	9
Dordogne	1	Savoie	2
Eure	4	Seine	183
Finistère	1	Seine-et-Marne	9
Gard	1	Seine-et-Oise	44
Ille-et-Vilaine	10	Seine-Inférieure	30
Indre	2	Sèvres (Deux-)	2
Indre-et-Loire	3	Somme	1
Loire	1	Var	1
Loir-et-Cher	5	Vienne	1
Loire-Inférieure	29	Yonne	6
Loiret	2		

Le tableau de la page suivante indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine.

Depuis 1911, l'Institut Pasteur a adopté la méthode de conservation en glycérine des moelles atténuées, introduite dans la pratique par A. Calmette.

On se sert de pots-bans d'une contenance de 50 cent. cubes.

Dans chacun, on verse 25 cent. cubes de glycérine neutre à 30° B°.

ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100	ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100
1886	2.671	25	0,94	1911	341	1	0,29
1887	2.770	14	0,79	1912	395	0	0,00
1888	1.622	9	0,55	1913	330	0	0,00
1889	1.830	7	0,38	1914	373	0	0,00
1890	1.540	5	0,32	1915	654	1	0,15
1891	1.559	4	0,25	1916	1.388	3	0,21
1892	1.793	4	0,22	1917	1.543	4	0,26
1893	1.648	6	0,36	1918	1.803	3	0,16
1894	1.387	7	0,50	1919	1.813	3	0,16
1895	1.520	5	0,38	1920	1.126	6	0,53
1896	1.308	4	0,30	1921	998	1	0,10
1897	1.529	6	0,39	1922	754	0	0,00
1898	1.465	3	0,20	1923	727	0	0,00
1899	1.614	4	0,25	1924	764	1	0,14
1900	1.420	4	0,28	1925	782	0	0,00
1901	1.321	5	0,38	1926	631	0	0,00
1902	1.005	2	0,18	1927	639	0	0,00
1903	628	2	0,32	1928	671	0	0,00
1904	755	3	0,39	1929	542	0	0,00
1905	721	3	0,41	1930	589	0	0,00
1906	772	1	0,13	1931	531	0	0,00
1907	786	3	0,38	1932	561	0	0,00
1908	524	1	0,19	1933	443	0	0,00
1909	467	1	0,21				
1910	401	0	0,00				

On stérilise à 120°, pendant vingt minutes.

On laisse refroidir et on introduit dans chaque pot-ban quelques fragments de moelles préalablement desséchées dans un flacon de potasse, d'après la méthode initiale de Pasteur.

On conserve ces pots-bans à la glacière aux environs de + 3°.

Pour éviter toute infection, on saigne les lapins dès que la paralysie des trains postérieur et antérieur est complète et on extrait immédiatement la moelle par la méthode d'Oshida, au moyen d'un mandrin métallique nickelé, stérile.

On n'utilise, pour la vaccination des personnes mordues, que des moelles ayant séjourné moins de *vingt jours en glycérine*, l'expérience ayant démontré que le degré d'atténuation de chaque moelle n'est pas sensiblement modifié pendant les vingt premiers jours. Chaque sujet en traitement reçoit environ, journellement, 2 à 3 millimètres de moelle triturée dans 3 centimètres cubes d'eau distillée stérilisée.

Le virus fixe de passage actuellement utilisé est le même que celui dont on s'est toujours servi depuis la création du service

de vaccinations antirabiques, d'abord rue d'Ulm, et ensuite (à partir de 1888) à l'Institut Pasteur.

Il convient de signaler que, depuis le *19 août 1911*, les inoculations de passage du virus fixe sont toujours effectuées, non plus avec le bulbe frais de lapin rabique, mais avec le bulbe conservé depuis au moins quarante-huit heures en glycérine à la glacière.

Depuis que cette technique a été adoptée, nous n'avons jamais constaté de modifications dans les délais d'incubation de la maladie après inoculation sous la dure-mère.

11° Mesures prises en vue de poursuivre l'évolution des cas traités pendant six mois au minimum.

Les médecins et les vétérinaires, ayant adressé des personnes mordues, sont priés de nous tenir au courant des accidents qui pourraient se produire ultérieurement.

12° Accidents paralytiques : Néant.

13° Décès : Néant.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées	443
Mort	0
Mortalité p. 100	0

ERRATUM

Ces Annales, t. LII, p. 482, 4^e ligne, Mémoire A. C. Marie : au lieu de « l'étuve cet alcaloïde », lire « l'étuve avec cet alcaloïde ».

TABLE DES MATIÈRES

DU TOME LII

La paralysie diphtérique expérimentale, par G. RAMON, Robert DEBRÉ et Pierre UHRY	5
Étude expérimentale de la thermothérapie générale par les radiations à ondes courtes, par C. LEVADITI et H. DE ROTHSCHILD, en collaboration avec J. AUCLAIR, P. HABER, A. VAISMAN et M ^{lle} R. SCHÖEN	23
Recherches sur le latex de l'arbre à laque du Cambodge (<i>Melanorrhoea laccifera</i> Pierre), par Gabriel BERTRAND et Georges BROOKS	68
Sur la nutrition de quelques champignons saprophytes et parasites, par Michel VOLKONSKY	76
Études immunologiques sur le curare, par J.-A. VEL-LARD et A. DE ASSIS.	102
Recherches sur la fixation du principe lytique dit « bactériophage », par Willy MUTSAARS	118
† Jean CANTACUZÈNE, 1863-1934.	137
De l'infection rabique par la voie péritonéale, par A.-C. MARIE.	141
Étude comparative de la réaction de floculation de Ramon, effectuée avec une quantité d'antigène constante ou avec une quantité d'antisérum constante, par le D ^r W. Aeg. TIMMERMAN	146
Lésions histologiques dans la peste pulmonaire primitive expérimentale du cobaye, par J. BABLET et G. GIRARD	153
Transmission naturelle et expérimentale à l'homme du spirochète infectant dans la nature, à Dakar, la tique : <i>Ornithodoros erraticus</i> Vel <i>Maroccanus</i> , par C. MATHIS, C. DURIEUX et M. ADVIER	166

Sur les propriétés biochimiques et sérologiques du <i>B. typhi flavum</i> , par M ^{lle} J. SEYDEL	179
Le mécanisme de la réaction de Henry, par V. CHORINE et R. GILLIER	193
Recherches sur les brûlures, par S. NICOLAU et P. POIN- CLOUX.	217
Pasteur à Lille, par Gabriel BERTRAND	241
Sur la teneur comparée en zinc des feuilles vertes et des feuilles étiolées, par Gabriel BERTRAND et M ^{lle} AN- DREITCHEVA	249
Développement et évolution de la sensibilité à la tuber- culine chez le cobaye, par A. BOQUET et J. BRETEY	252
Études chimiques sur le bacille tuberculeux (<i>premier mémoire</i>). Essais préliminaires d'extraction et de fractionnement des substances lipoidiques de corps bacillaires tués par la chaleur, par Michel MACHE- BŒUF, Georgette LÉVY et Norbert FETHKÉ, avec la collaboration de J. DIERYCK et A. BONNEFOI	277
Recherches sur l'anatoxine diphtérique récupérée, par N. N. SPASSKY et H. J. ODRINA	308
Formule leucocytaire dans les intoxications; mégamo- nonucléose, par S. NICOLAU, P. POINCLOUX, L. KOP- CLOWSKA et G. BALMUS	316
Sur quelques facteurs physico-chimiques de l'écologie larvaire des anophèles au Tonkin (<i>deuxième note</i>), par H.-G.-S. MORIN et H. BADER.	332
Traitement antirabique au Tonkin et mortalité chez les sujets traités pendant une période de sept années (1 ^{er} janvier 1926-31 décembre 1932), par J. GENEVRAY et J. DODERO.	352
Contribution à l'étude du virus de la « Maladie d'Au- jeszky », par P. REMLINGER et J. BAILLY (<i>premier mémoire</i>).	361
Mise en évidence du virus tuberculeux dans divers produits pathologiques et en particulier dans le sang par la méthode des injections d'extrait acéto- nique de bacilles de Koch. Caractères des souches de bacilles tuberculeux ainsi isolés, par M. J. BEE- RENS	406

Étude des pigments caroténoïdes et de quelques bactéries, par ERWIN CHARGAFF	415
Deux cas d'ostéites dues, d'une part, au <i>Sporotrichum gougeroti</i> et, d'autre part, à une levure, par A.-R. SARTORY et J. et M. MEYER	424
Étude chronaxique de la poliomyélite expérimentale du singe, par A. et B. CHAUCHARD, B. ERBER et P. MOLLARET	444
Résultats des vaccinations antirabiques pratiquées, de 1928 à 1932, au laboratoire antirabique de l'Université impériale de Kioto, par Jun-Itchi FUNAYAMA . .	473
La toxicité de l'aluminium selon la voie d'entrée, par Gabriel BERTRAND et P. SERBESCU	478
De quelques propriétés biologiques de l'adrénaline, par A.-C. MARIE	481
Sur les propriétés biologiques des bacilles tuberculeux atténués par réensemencements précoces, par L. NÈGRE et J. VALTIS	488
Sur l'activation <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de l'antigène méthyllique de Boquet et Nègre, par C. NINNI	502
Influence de quelques bactéries et champignons sur la culture de trypanosomides, par J. COLAS-BELCOUR . .	533
Recherches sur le sérum et sa température critique (<i>huitième mémoire</i>), pouvoir émulsionnant du sérum, « nombre d'éther », par F. SEELICH	540
Recherches sur la fièvre jaune expérimentale de la souris et du cobaye, par G.-J. STEFANOPOULOU	553
Contribution à l'étude de la toxine staphylococcique, par P. NÉLIS avec la collaboration de J.-J. BOUCKHAERT et E. PICARD	597
Études sur la bacillémie tuberculeuse. Recherches expérimentales et cliniques, par A. SAENZ	645
Essais d'immunisation par inhalation, diphtérie et tétanos, par W. SILBERSCHMIDT	690
Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1933, par Jules VIALA	709

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME LII

ADVIER (M.)	Voir Mathis (C.).	
ANDREITCHOVA (M ^{lle})	Voir Bertrand (Gabriel).	
ASSIS (A. de)	Voir Vellard (J.-A.).	
AUCLAIR (J.).	Voir Levaditi (C.).	
BABLET (J.) et GIRARD (G.)	Lésions histologiques dans la peste pulmonaire primitive expérimentale du cobaye	135
BADER (H.)	Voir Morin (H.-G.-S.).	
BAILLY (J.)	Voir Remlinger (P.).	
BALMUS (G.).	Voir Nicolau (S.).	
BEERENS (M. J.)	Mise en évidence du virus tuberculeux dans divers produits pathologiques et en particulier dans le sang par la méthode des injections d'extrait acé- tonique de bacilles de Koch. Carac- tères des souches de bacilles tuber- culeux ainsi isolés.	406
BERTRAND (Gabriel)	Pasteur à Lille	241
BERTRAND (Gabriel) et M ^{lle} AN- DREITCHOVA	Sur la teneur comparée en zinc des feuilles vertes et des feuilles étiolées.	249
BERTRAND (Gabriel) et BROOKS (Georges).	Recherches sur le latex de l'arbre à laque du Cambodge (<i>Melanorrhoea</i> <i>laccifera</i> Pierre).	68
BERTRAND (Gabriel) et SER- BESCU (P.).	La toxicité de l'aluminium selon la voie d'entrée	478
BONNEFOI (A.).	Voir Machebœuf (Michel).	
BOQUET (A.) et BRETEY (J.)	Développement et évolution de la sen- sibilité à la tuberculine chez le co- baye	252
BRETEY (J.)	Voir Boquet (A.).	
BROOKS (Georges)	Voir Bertrand (Gabriel).	
† CANTACUZÈNE (Jean)		137

CHARGAFF (Erwin)	Étude des pigments caroténoïdes de quelques bactéries.	415
CHAUCHARD (A. et B.), ERBER (B.) et MOLLARET (P.) . . .	Étude chronaxique de la poliomyélite expérimentale du singe	444
CHORINE (V.) et GILLIER (R.) . .	Le mécanisme de la réaction de Henry.	193
COLAS-BELCOUR (J.)	Influence de quelques bactéries et champignons sur la culture de trypanosomides	533
DEBRÉ (Robert)	Voir Ramon (G.).	
DIERYCK (J.)	Voir Machebœuf (Michel).	
DODERO (J.)	Voir Genevray (J.).	
DURIEUX (C.)	Voir Mathis (C.).	
ERBER (B.)	Voir Chauchard (A.).	
FETHKÉ (Norbert)	Voir Machebœuf (Michel).	
FUNAYAMA (Jun-Itchi)	Résultats des vaccinations antirabiques pratiquées, de 1925 à 1933, au laboratoire antirabique de l'Université impériale de Kioto.	473
GENEVRAY (J.) et DODERO (J.) .	Traitement antirabique au Tonkin et mortalité chez les sujets traités pendant une période de sept années (1 ^{er} janvier 1926-31 décembre 1932).	352
GILLIER (R.)	Voir Chorine (V.).	
GIRARD (G.)	Voir Bablet (J.).	
HABER (P.)	Voir Levaditi (C.).	
KOPCIEWSKA (L.)	Voir Nicolau (S.).	
LEVADITI (C.), ROITHSCHILD (H. de), AUCLAIR (J.), HABER (P.), VAISMAN (A.) et SCH (M ^{lle} R.)	Étude expérimentale de la thermothérapie générale par les radiations à ondes courtes.	23
LÉVY (Georgette)	Voir Machebœuf (Michel).	
MACHEBŒUF (M.), LÉVY (Georgette), FETHKE (N.), avec la collaboration de DIERYCK (J.) et BONNEFOI (A.) . . .	Études chimiques sur le bacille tuberculeux (<i>premier mémoire</i>). Essais préliminaires d'extraction et de fractionnement des substances lipoidiques de corps bacillaires tués par la chaleur.	277
MARIE (A.-C.)	De l'infection rabique par la voie péritonéale.	141
—	De quelques propriétés biologiques de l'adrénaline.	481

MATHIS (C.), DURIEUX (C.) et ADVIER (M.)	Transmission naturelle et expérimentale à l'homme du spirochète infectant dans la nature, à Dakar, latique : <i>Ornithodoros erraticus</i> Vel <i>maroccanus</i>	166
MEYER (J. et M.)	Voir Sartory (A.-R.).	
MOLLARET (P.)	Voir Chauchard (A.).	
MORIN (H.-G.-S.) et BADER (H.) .	Sur quelques facteurs physico-chimiques de l'écologie larvaire des anophèles au Tonkin (<i>deuxième note</i>) . .	332
MUTSAARS (Willy)	Recherches sur la fixation du principe lytique dit « bactériophage »	118
NÈGRE (L.) et VALTIS (J.) . .	Sur les propriétés biologiques des bacilles tuberculeux atténués par réensemencements précoces	488
NÉLIS (P.)	Contribution à l'étude de la toxine staphylococcique	597
NICOLAU (S.) et POINCLoux . .	Recherches sur les brûlures	217
NICOLAU (S.), POINCLoux (P.), KOPCIEWSKA (L.) et BALMUS (G.)	Formule leucocytaire dans les intoxications; mégamononucléose	316
NINNI (C.)	Sur l'activation <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> de l'antigène méthylique de Boquet et Nègre.	502
ODRINA (H.-J.)	Voir Spassky (N. N.).	
POINCLoux (P.)	Voir Nicolau (S.).	
RAMON (G.), DEBRÉ (Robert) et UHRY (Pierre)	La paralysie diphtérique expérimentale.	5
REMLINGER (P.) et BAILLY (J.) .	Contribution à l'étude du virus de la « Maladie d'Anjeszky » (<i>premier mémoire</i>)	361
ROTHSCHILD (H. de)	Voir Levaditi (C.).	
SAENZ (A.)	Études sur la bacillémie tuberculeuse. Recherches expérimentales et cliniques	64
SARTORY (A.-R. et J.) et MEYER (M.)	Deux cas d'ostéites dues, d'une part, au <i>Sporotrichum gougeroti</i> et, d'autre part, à une levure.	424
SCHEN (M ^{lle} R.)	Voir Levaditi (C.).	
SEELICH (F.)	Recherches sur le sérum et sa température critique (<i>huitième mémoire</i>), pouvoir émulsionnant du sérum, « nombre d'éther »	540

SERBESCU (P.)	Voir Bertrand (Gabriel).	
SEYDEL (M ^{lle} J.)	Sur les propriétés biochimiques et sérologiques du <i>B. typhi flavum</i>	179
SILBERSCHMIDT (W.)	Essais d'immunisation par inhalation, diphtérie et tétanos	690
SPASSKY (N. N.) et ODRINA (H. J.)	Recherches sur l'anatoxine diphtérique récupérée	308
STEFANOPOULO (G. J.)	Recherches sur la fièvre jaune expérimentale de la souris et du cobaye	553
TIMMERMAN (Dr W. Aeg.)	Étude comparative de la réaction de flocculation de Ramon, effectuée avec une quantité d'antigène constante.	146
UHRY (Pierre)	Voir Ramon (G.).	
VAISMAN (A.)	Voir Levaditi (C.).	
VALTIS (J)	Voir Nègre (L.).	
VELLARD (J.-A.) et ASSIS (A. de)	Études immunologiques sur le curare	102
VIALA (Jules)	Les vaccinations antirabiques à l'Institut Pasteur en 1933.	709
VOLKONSKY (Michel)	Sur la nutrition de quelques champignons saprophytes et parasites	76

Le Gérant : G. MASSON.